

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO

Colegio de Postgrados

Caracterización de dos morfotipos encontrados en machos de *Lutzomyia (Psychodopygus) geniculata* mediante marcadores morfométricos y moleculares.

Rommy Ivette Terán Soto

Tesis de grado presentada como requisito para la obtención del título de Maestría en Microbiología.

Quito, septiembre del año 2006

Universidad San Francisco de Quito

Colegio de Postgrados

HOJA DE APROBACIÓN DE TESIS

Caracterización de dos morfotipos encontrados en machos de *Lutzomyia (Psychodopygus) geniculata* mediante marcadores morfométricos y moleculares.

Rommy Ivette Terán Soto

Renato León, Ph. D.
Director de Tesis

Venancio Arahana, Ph. D.
Miembro del Comité de Tesis

Gabriel Trueba, Ph. D.
Director de la Maestría en Microbiología y
Miembro del Comité de Tesis

Hugo Valdebenito, Ph. D.
Decano del Colegio de
Ciencias Biológicas y Ambientales

Víctor Viteri Breedy, Ph. D.
Decano del Colegio de Postgrados

Quito, septiembre del año 2006

© Derechos de autor
Rommy Ivette Terán Soto
2006

Dedicatoria

A mi madre.

Agradecimientos

Quiero agradecer a Renato León por la importante guía para la realización de este trabajo. A Gabriel Trueba y Venancio Arahana por su ayuda siempre oportuna. A nuestros colaboradores: Lorenza Beati, Francois Le Pont, Marco Neira, Micah Dunthorn y al personal de la estación de biodiversidad Tiputini por el valioso aporte brindado. A toda la gente de la Maestría en Microbiología, amigos y profesores de quienes tengo los más lindos recuerdos del tiempo compartido. Un especial agradecimiento a mis padres por su apoyo y bendición de cada día y a mis queridos hermanos por la paciencia y el abrazo cariñoso cuando más los necesité.

Resumen

El estudio preliminar de la fauna de flebótomos (Diptera:Psychodidae: Phlebotominae) en tres localidades de la Amazonia ecuatoriana (Tiputini, Yasuní y Mondaña) reveló la presencia de diferencias morfológicas en la genitalia de algunos especímenes machos de *Lutzomyia geniculata* (Barreto, 1962) lo que llevó a agrupar a los ejemplares en dos morfotipos distintos: (1) con coxite delgado, y (2) con coxite grueso. Mediante la medición de los principales caracteres taxonómicos y su análisis estadístico mediante pruebas paramétricas y no paramétricas, así como del análisis filogenético de las secuencias de ADN de dos genes mitocondriales (citocromo b y ARNr 12S), se buscó determinar si nuestras observaciones corresponden a diferencias intra o interespecíficas. Los resultados de los análisis morfométricos apoyan la hipótesis de especies crípticas. Sin embargo, los resultados de la comparación de las secuencias de ADN mostraron que los ejemplares tienen una distribución polifilética, lo cual sería consistente con la hipótesis de que ambos morfotipos pertenecen a la misma especie. Tomando en conjunto estos resultados se piensa que podría tratarse de un fenómeno de polimorfismo ligado al cromosoma Y debido a que la variación morfológica se evidencia únicamente en los machos. Por otro lado y debido a que los machos de los dos morfotipos han sido capturados en la misma área geográfica, la variación encontrada podría indicar un proceso de especiación simpátrica o especiación incipiente. Nuestros resultados aparentemente contradictorios de los análisis moleculares con los morfométricos, sugieren que el estudio de la variación morfológica encontrada necesita ser profundizado y que el uso de los parámetros morfológicos con fines taxonómicos, debería hacerse con precaución y siempre acompañado de datos moleculares.

Abstract

A preliminary study of the Ecuadorian Amazon basin phlebotomine sand fly (Diptera:Psychodidae:Phlebotominae) at three collection sites (Tiputini, Yasuní and Mondaña) revealed the presence of morphological variation in the male genitalia of *Lutzomyia geniculata* (Barreto, 1962). According to the size and shape of the coxite, male specimens were separated into two groups: thick and thin coxite males. Experiments were conducted to elucidate whether these differences corresponded to intra or interspecific variation. Specimens from both groups were examined for morphometric variation and results statistically analyzed using parametric and non-parametric tools. Furthermore, fragments of the mitochondrial small subunit (12SrRNA) ribosomal and cytochrome b genes were phylogenetically analyzed. Our morphometric results indicated the presence of two distinct *L. geniculata* populations suggesting a process of cryptic speciation; however, the phylogenetic analysis showed that sequences were clustered into polyphyletic clades supporting the hypothesis of the presence of only one species. The variation was only observed in male specimens thus a possible explanation would be that the alleles that determine coxite size and shape may be linked to the sex chromosome and thus the differences observed corresponded to intraspecific variation and a chromosome Y linked polymorphism. Alternatively and considering that specimens showing the coxite variation were collected from the same localities, the variation found may indicate a process of sympatric or incipient speciation as somehow suggested by our morphometric data. The variation found needs to be further studied and our apparently contradictory results suggest that taxonomic studies based on morphological data must be further molecularly analyzed in order to provide more accurate results.

Tabla de contenidos.

1. Introducción.	1
1.1. Generalidades.	1
1.1.1. Los flebótomos.	1
1.1.2. Flebótomos como vectores de leishmaniasis.	2
1.2. Clasificación taxonómica del vector.	4
1.2.1. Antecedentes.	4
1.2.1.1. Características de los flebótomos pertenecientes al subgénero <i>Psychodopygus</i> .	5
1.2.2. Metodología clásica para la identificación de flebótomos.	6
1.2.3. Taxonomía molecular en la identificación de vectores.	7
1.2.3.1. Proteínas como marcadores taxonómicos.	8
1.2.3.2. Ácidos nucleicos como marcadores taxonómicos.	8
1.3. Secuencias de Genes y Taxonomía.	11
1.3.1. Inferencia filogenética.	12
1.3.2. Estimación de la confiabilidad de los árboles filogenéticos inferidos.	13
1.4. Genética de poblaciones y especiación.	13
1.4.1. La ley de Hardy – Weinberg.	15
1.4.2. Reloj evolutivo molecular.	16
1.4.3. El análisis de las secuencias de los genes mitocondriales en sistemática molecular en <i>Lutzomyia</i> .	17

PARTE II

Caracterización de dos morfotipos encontrados en machos de *Lutzomyia (Psychodopygus) geniculata*.

	18
2. Objetivos.	19
2.1. Generales.	19
2.2. Específicos.	19
2.2.1. Morfológico.	19
2.2.2. Morfométrico.	19
2.2.3. Molecular y Filogenético.	19
3. Materiales y métodos.	20
3.1. Estudio entomológico.	20
3.1.1. Área del estudio y periodo de recolección.	20
3.1.2. Colección de especímenes y biotipos.	20
3.1.3. Identificación de especies.	20
3.2. Morfometría.	21
3.3. Análisis molecular.	22
3.3.1. Extracción de ADN y preparación de la muestra para PCR.	22
3.3.2. Diseño de los primers.	22
3.3.3. Condiciones de amplificación.	23
3.3.4. Purificación y secuenciamiento.	24
3.4 Análisis filogenético.	24
4. Resultados.	24
4.1 Morfológicos.	25
4.2 Morfométricos.	25
4.3 Análisis molecular y filogenético.	25
5. Discusión.	26
6. Referencias.	43

Índice de Tablas

Tabla 1. Lista preliminar de flebótomos colectados.	29
Tabla 2. Medidas de los caracteres taxonómicos de ejemplares machos de <i>L. geniculata</i> .	30
Tabla 3. Valores de p para los caracteres taxonómicos medidos.	31

Índice de Figuras

PARTE I

1. Introducción.

1.1. Generalidades.

1.1.1. Los flebótomos.

Los flebótomos (Díptera:Psychodidae:Phlebotominae) son pequeños Dípteros Nematóceros que se caracterizan por su tamaño entre 2 a 3 mm, cuerpo cubierto de vellosidades y generalmente de apariencia blanquecina, alas erectas y patas relativamente largas (figura 1). Su interés médico radica en que las hembras al ser hematófagas, son vectores de importantes enfermedades que afectan al ser humano como la leishmaniasis y la bartonellosis. También han sido incriminadas en la transmisión de varios arbovirus entre ellos los Phlebovirus, Vesiculovirus y varios Orbivirus (Santamaría et al., 2002; Ghosh et al., 1999).

La clasificación taxonómica de flebótomos más comúnmente aceptada en la actualidad es la descrita por Lewis et al (1977), en la cual se reconocen tres géneros de flebótomos en el Nuevo Mundo (*Lutzomyia*, *Brumptomyia* y *Warileya*) y dos géneros en el Viejo Mundo (*Phlebotomus* y *Sergentomyia*). Más de 500 especies de flebótomos han sido descritas, la más alta concentración de especies proviene de los bosques de América del Sur, donde el género *Lutzomyia* es el que predomina (Sacks & Kamhawi, 2001). Este género comprende aproximadamente 400 especies de flebótomos, de las cuales al menos 33 han sido incriminadas como vectores de enfermedades (Beati et al., 2004). La transmisión del parásito *Leishmania* spp se da exclusivamente por la picadura de flebótomos hembras del género *Phlebotomus* en el Viejo Mundo y *Lutzomyia* en el Nuevo Mundo (Hashiguchi, 2001).

Estos Dípteros Nematóceros están mayormente distribuidos en zonas tropicales y subtropicales, aunque son encontrados en una amplia variedad de hábitats como el desierto, el bosque húmedo e intradomiciliariamente (Young & Duncan, 1994; Tesh & Guzman, 1996). Su ciclo de vida es terrestre y se inicia con la forma de huevo, 4 estadíos larvales, pupa y finalmente la forma adulta. Debido a su pequeño tamaño y hábitos de desarrollo, las formas inmaduras son extremadamente difíciles de localizar en el campo. La mayoría de los conocimientos recopilados, indican que los huevos son depositados

individualmente en grietas, cuevas de animales, cavidades de árboles grandes, sitios de almacenamiento, refugios de animales domésticos y entre restos de flores y materia orgánica (Tesh & Guzman, 1996).

1.1.2. Flebótomos como vectores de leishmaniasis.

De las enfermedades transmitidas por los flebótomos, la leishmaniasis es la más importante. Es endémica en 88 países de los cuatro continentes, 16 son países desarrollados y 72 son países en desarrollo (Hashiguchi, 2004). La Organización Mundial de la Salud (OMS) indica que el estatus global de esta enfermedad, sin contar las epidemias, es el siguiente: 57,000 muertes anualmente, 1.98 millones portan la enfermedad, 350 millones de personas están en riesgo y al menos 12 millones la padecen en el mundo entero (Hashiguchi, 2004). Las cifras definitivas pueden ser aún mayores debido a los subregistros especialmente en las zonas rurales (Davies et al., 2000). Las cicatrices deformantes y los problemas de salud causados por la leishmaniasis constituyen un perjuicio social y pueden llevar a la marginación de los individuos afectados (WHO, 1996).

Los parásitos causantes de la leishmaniasis son protozoos hemoflagelados del orden Kinetoplástida y familia Trypanosomatidae (Sacks & Kamhawi, 2001; Hashiguchi, 2001). Las más de 20 especies, que han sido incriminadas como agentes causales de leishmaniasis humana en el mundo entero, pertenecen al género *Leishmania*, que incluye dos subgéneros, *Leishmania* y *Viannia* (Gállego, 1998). El subgénero *Leishmania* incluye las especies que se desarrollan en el intestino anterior y medio del flebótomo y el subgénero *Viannia* en el intestino medio y posterior (Lainson & Shaw, 1987). En los países andinos, la mayoría de las infecciones humanas son causadas por parásitos del subgénero *Viannia* (Davies et al., 2000).

El ciclo de vida de los parásitos de *Leishmania* es dimórfico. La forma conocida como amastigote se observa en el sistema fagocítico mononuclear del huésped mamífero y la forma de promastigote se desarrolla en el tubo digestivo del vector y en medios de cultivo específicos como el NNN, medios difásicos, etc (Hashiguchi, 2004).

Hashiguchi (2001), hace una revisión de las formas clínicas de la leishmaniasis, y la clasificación que adopta es la siguiente: Leishmaniasis visceral

(LV), cutánea (LC), mucocutánea (LMC), cutánea difusa (LCD), y la dermal post-kala-azar (LDPK). La LV constituye la forma más seria y se caracteriza por abscesos febriles, substancial pérdida de peso, hepato y esplenomegalia y anemia. La fatalidad de la LV puede llegar al 100% si no es tratada. En el caso de la LC se observa la presencia de úlceras a nivel de la piel, que ocasionalmente cicatrizan sin tratamiento. También pueden presentarse nódulos que dejan cicatrices permanentes en la piel expuesta de cara y extremidades, confiriendo al huésped inmunidad de larga vida contra la infección de la misma especie o subespecies del género *Leishmania* (Hashiguchi, 2001).

De los 2 millones de nuevos casos que se registran por año, 1.5 millones son de LC, LCD y LMC y 500 000 corresponden a casos de LV (Desjeux, 1996). Más del 90% de los casos reportados de LV proceden de Bangladesh, Brasil, India y Sudán y más del 90% de los casos de LC que se registran en el Viejo Mundo proceden de Afganistán, Irán, Arabia Saudita y la República Árabe de Siria, mientras que en el Nuevo Mundo, los países más afectados son Brasil y Perú (Desjeux, 1996).

Las formas mucocutánea, cutánea difusa y la kala-azar, en especial la segunda, son usualmente resistentes a las drogas comercialmente disponibles. La LMC, conduce a la destrucción parcial o total de las mucosas de nariz, boca y garganta así como de los tejidos circundantes incluyendo el cartílago, lo cual se acompaña de serias infecciones secundarias. La variabilidad de los síntomas clínicos, depende no solamente de la especie del parásito causal, sino también de las condiciones fisiológicas e inmunológicas del hospedador afectado, lo cual podría variar con la edad, factores genéticos e inclusive con el estatus nutricional (Hashiguchi, 2001; Davies et al., 2000).

La leishmaniasis fue reportada por primera vez en el Ecuador en el año de 1920 por Valenzuela (Rodríguez, 1974; Hashiguchi, 2004). La enfermedad es endémica en varias localidades de la costa, Amazonía y de la sierra Ecuatoriana, constituyéndose un importante problema de salud comunitaria en las zonas afectadas. El Ministerio de Salud Pública reporta que dentro de los últimos 14 años, 21,805 casos han sido documentados en 20 de las 22 provincias, exceptuando Galápagos y Carchi (MSP, 2004). La leishmaniasis de tipo cutánea es la forma más común de la enfermedad, seguida por la forma mucocutánea; las

dos se presentan con un variado espectro de manifestaciones clínicas (Hashiguchi, 2004).

Cinco especies del parásito, han sido reconocidas como causales de la enfermedad en el Ecuador. Aunque son morfológicamente similares, la patología, características clínicas, distribución geográfica y ciclo natural, son marcadamente diferentes: *L. (L.) mexicana* y *L. (L.) major-like* son las especies descritas en la región de los Andes donde la leishmaniasis cutánea (LC) es la forma que predomina, mientras que *L. (V.) panamensis* seguida de *L. (V.) guyanensis* se han encontrado en las zonas tropicales y subtropicales de la región costa. En la región Amazónica, *L. (V.) braziliensis* ha sido incriminada como agente causal de la forma mucocutánea, reportada únicamente en esta región (Hashiguchi, 2004; Amunarriz, 1982, 1984).

En cuanto al vector, CIPA (2001) mantiene un record de 63 especies de flebótomos distribuidas en el país. Varios trabajos de colección, identificación y disección de especímenes en áreas endémicas, han determinado a las siguientes especies como las principales vectoras de *Leishmania*: *Lutzomyia trapidoi*, *L. hartmanni* y *L. gomezi* en la región costa y amazónica y *L. ayacuchensis* en los Andes.

1.2. Clasificación taxonómica del vector.

1.2.1. Antecedentes.

La caracterización y diferenciación de las poblaciones de especies vectoras del parásito, así como de aquellas que no son competentes para la transmisión, es fundamental para estudios epidemiológicos y de control de la enfermedad (Dias et al., 1998). La taxonomía clásica, se basa en la observación de diferencias detectables en los caracteres morfológicos que han sido establecidos como taxonómicamente importantes. Sin embargo, se ha encontrado problemas con esta forma de clasificación, de los flebótomos por la presencia de especies distintas que tienen morfología similar (Dias et al., 1998). Dentro de estos estudios, la genitalia ha sido considerada clásicamente como una de las estructuras anatómicas más importantes en la clasificación taxonómica de *Lutzomyia* (Young & Duncan, 1994).

La clasificación de flebótomos del género *Lutzomyia*, que es el género más abundante en América del Sur y el que más especies vectoras comprende, ha

sido discordante. Basados en caracteres morfológicos, Young & Duncan (1994) y Galati (1995), han planteado separadamente, dos clasificaciones para este género. La clasificación de los flebótomos del género *Lutzomyia* planteada por Young & Duncan (1994) describe dentro de este género a siete subgéneros bien definidos: *Lutzomyia*, *Pintomyia*, *Viannamyia*, *Nyssomyia*, *Trichophoromyia*, *Psychodopygus* y *Helcocyrtomyia*. En la clasificación planteada por Galati se ubica a los flebótomos en una gran tribu denominada Phlebotomini, dentro de la cual se distinguen dos subtribus: Psychodopygina y Lutzomyina. En la tribu Psychodopygina se ubican los siguientes géneros: *Viannamyia*, *Psychodopygus*, *Nyssomyia*, *Bichromomyia* y *Trichophoromyia*, mientras que la tribu Lutzomyina consta de los siguientes cuatro géneros: *Lutzomyia*, *Pintomyia*, *Migonemyia* y *Evandromyia* (Galati, 1995).

Beati et. al., (2004), mediante el análisis de ejemplares capturados en Perú y Colombia, establecieron las relaciones filogenéticas del género *Lutzomyia*, basándose en el análisis de las secuencias de genes ribosomales mitocondriales y nucleares, ARNr 12S y ARNr 28S, respectivamente. Los resultados parecen apoyar más fuertemente la clasificación planteada por Galati (1995), sin embargo, análisis adicionales serán necesarios para adoptar definitivamente la nomenclatura y clasificación que Galati propone. Por último, el estudio de Beati y colaboradores demuestra la utilidad que las herramientas moleculares pueden tener para la identificación y clasificación de flebótomos y plantea la validez de los métodos moleculares para establecer las relaciones taxonómicas dentro de este grupo de vectores. En el presente trabajo se mantendrá la nomenclatura planteada por Young & Duncan (1994) por ser la más aceptada en donde *Lutzomyia geniculata* se ubica dentro del género *Lutzomyia*, subgénero *Psychodopygus*. La clasificación propuesta por Galati ubica a esta especie como *Psychodopygus geniculatus*.

1.2.1.1. Características de los flebótomos pertenecientes al subgénero *Psychodopygus*.

De un total de 63 especies de flebótomos (Díptera:Psychodidae) reportadas en el Ecuador, 34 pertenecen a este subgénero (CIPA, 2001). Sus miembros comparten las siguientes características físicas y morfológicas: coloración del cuerpo variable que puede ir de pálida a oscura, los ojos grandes,

el palpómero número 5 muy corto y los ascoides simples (sin ganchos). Las hembras se caracterizan principalmente por tener un cibarium que lleva de 4 a 8 dientes horizontales y un número variable de dientes verticales, el arco puede ser completo o incompleto, la faringe carece de espinas, la espermateca es imbricada (con anulaciones sobrepuestas), parte del conducto común así como los conductos espermáticos individuales son usualmente rugosos y estriados (figura 2 a). El coxite de los machos carece de setas persistentes, el estilo presenta de 1 a 6 espinas largas; las espinas pequeñas y las setas no siempre están presentes, el parámetro puede ser simple o altamente modificado y el lóbulo lateral carece de setas especializadas (figura 2 b) (Young & Duncan, 1994).

1.2.2. Metodología clásica para la identificación de flebótomos.

La sistemática de los flebótomos es compleja, existen discrepancias taxonómicas entre las clasificaciones propuestas. Esto se debe a diferentes factores, entre los principales están la morfología similar de las hembras (Young & Duncan, 1994), los polimorfismos intraespecíficos y la presencia de especies crípticas (Mukhopadhyay et al., 2001; Dujardin et al., 1996). La influencia de estos factores en el comportamiento del vector, requiere de más análisis, sin embargo, ha sido establecido que dentro del género *Lutzomyia*, la capacidad vectorial es altamente especie-específica y podría variar significativamente entre especies crípticas (Lampo et al., 1999).

La morfometría ha sido ampliamente usada para la caracterización y clasificación de especies de flebótomos (Dujardin & Le Pont, 2000; De la Riva et al., 2001; Dujardin et al., 2004; Young & Duncan, 1994), y trabajos basados en la observación de diferencias morfológicas dentro del género *Lutzomyia*, han tratado de explicar fenómenos de especiación críptica. Dujardin y colaboradores (1999) observaron variación en la longitud de los filamentos genitales en especímenes de *L. runoides* y determinaron mediante morfometría, la existencia de dos poblaciones viviendo en simpatria (en la misma localidad). Algunas especies simpátricas son especies crípticas. Son similares en apariencia o morfología pero están reproductivamente aisladas. Estas especies pueden diferir en comportamiento, fisiología o estructura cromosómica (Smith & Smith, 2001).

El proceso de caracterización de nuevas especies, involucra la medición de las estructuras en diferentes especímenes. En la cabeza se reporta el resultado de las siguientes medidas: largo y ancho, distancia interocular, largo y ancho de la faringe, longitud del labrum, de los flagelómeros y de los palpos. En especímenes hembras es importante además la observación del cibarium y los dientes. En las alas se determina largo y ancho, además de la longitud de las venas alares: alpha, betha, gamma y delta. Los caracteres taxonómicos en la genitalia comprenden: los filamentos genitales, la bomba genital, coxite, estilo y el lóbulo lateral en el macho. La forma y tamaño de la espermateca así como la observación de la furca genital en la hembra. Otras medidas en el tórax, abdomen y apéndices, también son consideradas en la identificación de los especímenes (figura 3 a, b, c y d).

1.2.3 Taxonomía molecular en la identificación de vectores.

La taxonomía molecular se basa en la comparación de moléculas (ácidos nucleicos y proteínas), las mismas que proveen importante información con relación a los procesos evolutivos de un organismo. La taxonomía molecular puede ser muy útil para profundizar en estudios de: especiación críptica, morfología similar y estudios con especies de pequeño tamaño (Black & Munstermann, 1996).

Un grupo de especies crípticas, referido también como complejo, se conforma de especies cercanamente relacionadas, que son reproductivamente aisladas pero que carecen de diferencias morfológicas notorias especialmente en las hembras. Frecuentemente estas especies no pueden ser separadas en base a la morfología de la espermateca. El estudio de este tipo de especiación es importante ya que las especies involucradas pueden diferir significativamente en la competencia vectorial, preferencia por el huésped, hábitat larvario y comportamiento alimenticio de las formas adultas (Black & Munstermann, 1996). Adicionalmente, la identificación de las especies dentro de estos complejos requiere de especímenes en estadios específicos del desarrollo, entrenamiento especializado para detectar pequeñas diferencias morfológicas y tener acceso a tecnología especializada, frecuentemente no disponible en países en desarrollo. Los factores antes mencionados limitan el desarrollo de estudios ecológicos y epidemiológicos, donde la identificación del vector es indispensable para adoptar

medidas de control. Estos organismos deben ser colectados y mantenidos vivos en el laboratorio para permitir que maduren hacia un estadio en el que su identificación sea posible. La mayoría de estos estudios también requieren de análisis microscópicos y métodos delicados de preservación y montaje (Black & Munstermann, 1996).

1.2.3.1. Proteínas como marcadores taxonómicos.

La electroforesis de isoenzimas ha sido el método de elección en estudios de variación intraespecífica, mapeo genético y en la identificación de un amplio grupo de animales y plantas (Black & Munstermann, 1996). En estudios de especies crípticas de flebótomos (Diptera:Psychodidae) ha probado ser una herramienta útil y exitosa (Lampo et al., 1999; Dujardin et al., 1996).

El principio de la electroforesis de isoenzimas es la separación de las proteínas en base a su tamaño y carga eléctrica (Black & Munstermann, 1996). Las diferencias observadas en la movilidad electroforética de las isoenzimas, son resultantes de sus diferencias a nivel de las secuencias del ADN. De esta manera, si los patrones de bandas difieren entre dos individuos se asume que estas diferencias tienen una base genética y son heredables (Grattapaglia, 1996).

Sin embargo, esta técnica no es muy útil cuando se quieren detectar los polimorfismos genéticos entre variedades o especies próximas, ya que la cantidad y los patrones de expresión de las proteínas pueden variar, dependiendo de la etapa de desarrollo de los ejemplares analizados. En etapas tempranas, frecuentemente se expresa menos enzima y ocasionalmente en diferentes formas (isoenzimas). Probablemente, la mayor desventaja del uso de las proteínas en la taxonomía molecular, es que son fácilmente degradables, lo que implica una pérdida rápida de su actividad enzimática. Esta inestabilidad se puede prevenir manteniendo los especímenes vivos y en buen estado hasta su llegada al laboratorio o también por conservación y transporte a bajas temperaturas (nitrógeno líquido o congeladora), desde el sitio de captura, lo cual constituye una limitación en sitios de difícil acceso o en zonas tropicales, donde la disponibilidad de energía eléctrica es limitada (Grattapaglia, 1996).

1.2.3.2. Ácidos nucleicos como marcadores taxonómicos.

Se pueden aplicar las siguientes técnicas: (a) la hibridización de sondas especie-específicas con ADN blanco de especímenes desconocidos, (b) la

reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para amplificar regiones tanto específicas como arbitrarias del genoma de especímenes desconocidos y que luego podrán ser secuenciadas y analizadas para la identificación de especies y (c) la secuenciación de ADN.

Las técnicas de hibridización de ADN, han sido aplicadas por ser sensibles, requerir una mínima preparación de las muestras y porque el tiempo que se necesita para visualizar los resultados es corto. Las desventajas, implican la dificultad y costo en el aislamiento e identificación de las sondas especie-específicas. De igual manera, la metodología se complica si se analiza un complejo con varias especies.

Las técnicas basadas en la PCR, son cada vez más usadas en taxonomía molecular por las ventajas que ofrecen. La cantidad de material que se necesita para iniciar la reacción es mínima, lo que permite incluso que cantidades limitadas de ADN sean suficientes para duplicar los experimentos y almacenar muestras para otros análisis. Por esta razón es posible también destinar una parte del cuerpo del espécimen para el estudio morfológico y morfométrico especialmente la cabeza, alas y la genitalia. Los especímenes secos o aquellos que han sido colectados en alcohol y sin necesidad de almacenamiento en frío, pueden ser utilizados. Las condiciones de trabajo así como la metodología pueden ser fácilmente estandarizadas y aprendidas.

Las desventajas de esta metodología, se relacionan principalmente con el costo que implica el equipamiento y la adecuación del laboratorio. Debido a que las muestras de ADN son susceptibles de contaminación, se debe contar con áreas separadas de trabajo tanto para la extracción como para la amplificación y electroforesis. Por otro lado, el diseño de las sondas (primers) requiere del conocimiento de las secuencias de ADN a ser amplificadas.

Estudios que buscan la diferenciación de especies de flebotomos viviendo en simpatria (Adamson et al., 1993), han empleado exitosamente, la técnica del ADN polimórfico amplificado al azar (RAPD), que por medio de la PCR, amplifica regiones arbitrarias del genoma usando un solo primer. Dias y colaboradores (1998), tras el análisis de cuatro poblaciones de laboratorio de *Lutzomyia longipalpis*, provenientes de diferentes áreas geográficas, determinaron por medio

de esta técnica, la existencia de polimorfismos de ADN que pueden ser útiles en la diferenciación de los grupos analizados.

La ventaja del RAPD-PCR, en relación a la técnica que utiliza primers específicos, es que no se requiere la información de toda la secuencia y el diseño de los primers es menos costoso. Sin embargo, se necesita de una rigurosa optimización y definición de las condiciones de amplificación para que los resultados sean reproducibles. Los patrones de bandas se ven afectados por la calidad del ADN y las condiciones de la reacción, haciendo difícil el análisis y comparación entre los grupos en estudio. El principal problema con esta metodología es que las bandas con idéntica movilidad en el gel pueden no ser homólogas, ellas podrían tener simplemente el mismo tamaño y consecuentemente la misma movilidad, y sin embargo, ser secciones del genoma totalmente diferentes.

En estudios que han buscado determinar la presencia de haplotipos se ha investigado las secuencias de nucleótidos de ciertos genes en *Lutzomyia longipalpis*, la técnica denominada "Single Strand Conformation Polymorphism" (SSCP) ha sido aplicada (Hodgkinson et al., 2002). Se basa en la observación de que el ADN monocatenario tiende a doblarse sobre si mismo, produciendo conformaciones que varían dependiendo de las secuencias de nucleótidos. Es una forma indirecta de investigar las secuencias de ADN. Estas diferencias se reflejan en la tasa de migración electroforética en un gel de poliacrilamida. Esta técnica es altamente sensible porque detecta diferencias en un solo nucleótido y porque especímenes que muestran la misma movilidad en el gel no registran variación en sus secuencias (Hodgkinson et al., 2002).

Finalmente, el secuenciamiento de genes ha puesto de manifiesto abundantes polimorfismos, lo cual ha permitido establecer los patrones de variación en las poblaciones naturales, hacer estimaciones de la proporción de los loci genéticos que son polimórficos en una especie determinada y, por tanto, susceptibles de cambiar, lo cual permite además, analizar los mecanismos e intensidad de los procesos que conducen a cambios en las frecuencias de los distintos genotipos y a hacer predicciones sobre la futura composición de la población según la intensidad de las fuerzas que actúen sobre ella (Piqueras et al., 2002).

1.3. Secuencias de Genes y Taxonomía.

Existe una relación fundamental entre estudios de sistemática y evolución molecular. La sistemática molecular usa marcadores genéticos para hacer inferencias sobre los procesos poblacionales y filogenéticos. Los estudios de evolución molecular usan estos datos para evaluar evolución a través del tiempo (Moritz & Hillis, 1996). La comparación de secuencias de genes parálogos, ortólogos y de pseudogenes permite hacer inferencias acerca de las relaciones evolutivas entre especies. Los genes parálogos se originan de un evento de duplicación que debe ser lo suficientemente reciente para revelar su ancestro común a nivel de nucleótidos o aminoácidos. La comparación de estos genes por análisis filogenético brinda información sobre eventos de duplicación. Los genes ortólogos son genes homólogos en diferentes especies que han iniciado una evolución separada debido a especiación. La comparación de estos genes informará sobre eventos de especiación. Los pseudogenes se definen como secuencias de nucleótidos similares a las de los genes conocidos pero que no se expresan (Vandamme, 2003). Los distintos genes presentan diferentes tasas de mutación a través del tiempo. Por ejemplo el ADN mitocondrial (ADN mt), transmitido por vía materna en animales (Black & Munstermann, 1996) es un parámetro que evidencia una historia evolutiva ligeramente distinta a la que podrían revelar las secuencias de genes nucleares (Black & Munstermann, 1996).

Los datos moleculares presentan conflictos frente a los datos morfológicos y esto ha generado controversia. Algunos grupos científicos han manifestado que los caracteres moleculares no son suficientes para determinar el estatus taxonómico de una especie, mientras que otros aseguran que los datos morfológicos son poco informativos (Moritz & Hillis, 1996). Sin embargo, es importante recalcar que las diferencias morfológicas son resultantes de diferencias en genes y que en muchos casos pequeñas diferencias en ciertos genes podrían producir enormes cambios morfológicos. En este caso, si nos basamos únicamente en la morfometría podríamos sobreestimar las divergencias evolutivas entre dos especies. No obstante, cuando se conozca exactamente la función de cada gen, los datos morfológicos deberán coincidir exactamente con los datos de las secuencias de los genes, como lo demuestra el estudio de los genes de los picos de los pinzones en Galápagos (Abzhanov et al., 2004), donde

la expresión del *Bmp4* está fuertemente relacionada con la morfología de los picos de los pinzones. El desarrollo de la sistemática molecular, no ha conseguido refutar ampliamente las hipótesis planteadas por los morfologistas, no obstante, la ventaja podría darse en situaciones donde la variación morfológica es limitada o cuando la homología de las características morfológicas no es clara.

1.3.1. Inferencia filogenética.

Los algoritmos matemáticos son herramientas muy útiles para entender la filogenia. Se disponen de los siguientes algoritmos de análisis: (1) Métodos de distancia como el Neighbor Joining (NJ) y el Unweighted pair-group method of arithmetic averages (UPGMA); (2) Maximum Parsimony (MP); (3) Maximum Likelihood (ML) y (4) Bayesian (BAY) (Hall, 2001).

Los métodos de distancia como NJ y UPGMA usan un algoritmo para construir un dendrograma. Ambos métodos usan una serie específica de cálculos para estimar un árbol. Estos cálculos involucran manipulaciones de una matriz de distancia que es derivada de un alineamiento múltiple. Por medio de estos métodos, se calcula para cada par de taxas la distancia, o la fracción de diferencias, entre las dos secuencias y se registra en la matriz (Swofford et al., 1996; Hall, 2001).

Maximum Parsimony, Maximum Likelihood y Bayesian son métodos en los que se construyen muchos árboles y luego se emplean algunos criterios para decidir cual es el mejor árbol o el mejor grupo de árboles. Los métodos mencionados usan el alineamiento múltiple directamente para comparar los caracteres dentro de cada columna (cada sitio) del alineamiento. Maximum parsimony se basa en la asunción de que el árbol más probable es aquel que requiere el mínimo número de cambios para explicar los datos en el alineamiento y que las secuencias analizadas tengan una tasa de mutación similar (Hall, 2001). El árbol considerado como óptimo bajo el criterio de ML, es aquel que más probablemente haya ocurrido de los datos observados y bajo el modelo de evolución asumido. ML ofrece las ventajas de que permite al usuario escoger el modelo de evolución que quiere emplear (dar mayor peso a transversiones que a transiciones) así como conocer la probabilidad del árbol resultante. Bayesian produce un grupo de árboles de probabilidades aproximadamente iguales. Se basa en el conocimiento de probabilidades posteriores o sea aquellas que han sido estimadas basándose en algún modelo y después de tener una idea

preliminar sobre los datos. Los resultados de este análisis son fáciles de interpretar porque la frecuencia de una agrupación dentro del grupo de árboles es virtualmente idéntica a la probabilidad de que esa agrupación sea verídica (Hall, 2001).

1.3.2. Estimación de la confiabilidad de los árboles filogenéticos inferidos.

Bootstrapping es un método estadístico ampliamente usado con la finalidad de estimar la confiabilidad de las agrupaciones resultantes en los árboles filogenéticos (Hall, 2001). Por medio de este método se toma una submuestra de los sitios en un alineamiento y se crean árboles basados en aquellas submuestras. Este proceso es generado en múltiples ocasiones (el número ideal es 1000, aunque un mínimo de 100 es aceptable) y los resultados son compilados para obtener un estimado de la confiabilidad de un agrupamiento particular. Al final, el árbol resultante muestra, para cada agrupación, el número de veces que esa agrupación ha ocurrido durante las repeticiones de bootstrap. Un valor de bootstrap del 90% es ampliamente confiable, mientras que uno del 25% no se considera como válido. Sin embargo, la interpretación de los valores de confiabilidad depende de lo que se está investigando y de las agrupaciones que se están analizando (Hall, 2001).

1.4. Genética de poblaciones y especiación.

La genética de poblaciones analiza la herencia en grupos de individuos, es decir, poblaciones de una especie determinada (Piqueras et al., 2002). Una especie se define como un grupo de individuos interfértiles que viven juntos en una misma región y bajo similares relaciones ecológicas (Smith & Smith, 2001).

La evolución consiste en cambios en las frecuencias génicas o alélicas como resultado de procesos sistemáticos y dispersivos. Entre los primeros se encuentran: mutación, recombinación, migración y la selección natural. La deriva génica es parte de los procesos dispersivos (Piqueras et al., 2002). La especiación, o sea la formación de nuevas especies y el desarrollo de diversidad dentro de las especies, ocurre cuando el flujo génico dentro de una población es interrumpido por un mecanismo de aislamiento. Cuando ocurre el aislamiento por separación geográfica o reproductiva, se inicia un proceso especiación alopátrica

(diferentes patrias) o dentro de la misma localidad (simpátrica o patria común). Algunas especies simpátricas son especies gemelas; son similares en apariencia y morfología pero difieren en comportamiento, requerimientos ecológicos, fisiología, estructura cromosómica o presentan incompatibilidad de genitalia por lo que no se cruzan. En general, se ha supuesto que la especiación alopátrica es el mecanismo principal a través del cual se originan las especies; sin embargo, cada vez se acumulan más pruebas de que la separación geográfica estricta no es necesaria para que ocurra especiación y de que la especiación simpátrica puede ser un mecanismo más generalizado e importante. Las poblaciones pueden aislarse genéticamente dentro de la misma área geográfica como resultados de patrones de comportamiento y reproducción como colonización, dispersión restringida de propágulos, reproducción asexual, selección, depredación, etc (Odum, 1986).

La selección natural, es el proceso por el que ciertos fenotipos mejor adaptados (consecuentemente los genotipos), dejan más descendientes que otros. La selección es una cuestión de éxito reproductivo, la contribución relativa que hace un genotipo a la siguiente generación. Con el tiempo, el éxito reproductivo diferencial de los organismos individuales cambia los rasgos genéticos de la población. Una medida del éxito reproductivo es la eficacia biológica, o valor adaptativo, de un genotipo y se mide por el número de descendientes fértiles después de varias generaciones. Si un organismo puede tolerar un determinado conjunto de condiciones como para dejar descendencia madura en la población, se dice que está adaptado a su medio ambiente (Smith & Smith, 2001; Tamarín, 1996).

Para que exista evolución es necesario que exista variación fenotípica (resultante de la mutación de genes), es decir la selección natural cambiará las frecuencias de los distintos tipos dentro de una especie solo si hay variantes que seleccionar (Piqueras et al., 2002). La variabilidad genética, que es la materia prima de la selección natural, surge de la mezcla de genes y cromosomas que se produce en la reproducción sexual. Cuando dos gametos se combinan para formar un cigoto, el contenido genético de los cromosomas de los padres se combina en la descendencia. Debido a que el número posible de recombinaciones es enorme, la recombinación es una fuente principal inmediata de variación. La recombinación

no cambia la información genética, sino que genera diferentes combinaciones de genes sobre los que la selección puede actuar. Como algunas combinaciones de genes son más eficaces que otras, la selección determina qué combinación sobrevive en la población (Smith & Smith, 2001).

Una mutación genética es una alteración en la secuencia de uno o más nucleótidos. Las mutaciones pueden ser neutras, beneficiosas o perjudiciales, dependiendo de las circunstancias del medio ambiente. En las mutaciones neutras, el aminoácido resultante es químicamente similar al que está reemplazando y en consecuencia no se observan diferencias apreciables en la proteína resultante. La mayoría de mutaciones genéticas no tienen efectos o tienen efectos nocivos. Sin mutaciones no habría selección natural. Si un alelo mutante es ventajoso o neutro, puede ser retenido en una población (Smith & Smith, 2001).

1.4.1. La ley de Hardy – Weinberg.

Esta ley sostiene que los distintos genotipos se mantendrán en equilibrio en una población, es decir las frecuencias alélicas se mantendrán constantes en una población con reproducción sexual, si se cumplen ciertos requisitos: (1) el apareamiento sea al azar, (2) no haya mutación, (3) la población sea grande, para que los efectos del azar sobre las frecuencias génicas sean insignificantes, (4) no haya selección natural, (5) no haya migración y (6) no haya deriva genética (Smith & Smith, 2001).

En las poblaciones naturales los criterios de esta ley rara vez se cumplen completamente, es decir, aparecen mutaciones, los apareamientos no son al azar, los individuos se desplazan de una población a otra y hay selección natural. Todas estas circunstancias contribuyen a cambiar las frecuencias genotípicas de una generación a la siguiente y actúan como fuerzas evolutivas en una población. Por esta razón la ley de Hardy – Weinberg debe considerarse teórica, pero de utilidad al ser una distribución con la que comparar nuestras observaciones (Smith & Smith, 2001). Las desviaciones de las frecuencias genotípicas del equilibrio de Hardy – Weinberg sugieren la presencia de presiones selectivas que actúan en la población. Una implicación importante de esta ley es que en la ausencia de fuerzas evolutivas específicas o fuerzas selectivas que cambien las frecuencias,

la herencia mendeliana por si sola es suficiente para mantener la variabilidad genética de una población.

Las fuerzas ambientales ya sean factores abióticos o bióticos favorecen ciertos genotipos, expresados por sus fenotipos. Con el tiempo estas presiones selectivas producen un cambio en las frecuencias génicas de la población o evolución. Cuando la selección natural favorece fenotipos cerca de la media poblacional a expensas de los dos extremos, se dice que la selección es estabilizadora y es característica de los ambientes estables. La selección es direccional cuando se favorece un fenotipo extremo sobre el otro de la distribución fenotípica, el fenotipo medio se desplaza hacia un extremo, siempre que exista variación heredable de tipo apropiado. Por ejemplo, si eliminamos (muerte real o imposibilidad de reproducirse) los individuos bajos, la media se moverá hacia el extremo de los altos (Smith & Smith, 2001; Tamarín, 1996). En algunas situaciones, la selección favorece ambos extremos simultáneamente, aunque no necesariamente en el mismo grado. Este tipo de selección se denomina disruptiva y ocurre cuando los miembros de una población están sometidos a diferentes presiones de selección en distintos ambientes, tales como micro-hábitats. El resultado de esta selección es la aparición de dos o más genotipos y posiblemente fenotipos (polimorfismo). La característica más importante de este polimorfismo es que las formas llegan a ser discontinuas (no existen individuos con fenotipos intermedios) (Smith & Smith, 2001; Tamarín, 1996).

1.4.2. Reloj evolutivo molecular.

La tasa de acumulación de mutaciones generalmente tiene una frecuencia que ha podido ser determinada por medios experimentales. Es posible por lo tanto suponer que existe una relación entre tiempo y acumulación de mutaciones. Esta hipótesis permite hacer estimaciones del tiempo de divergencia de dos taxones. A pesar de que existe una tasa de mutaciones universal, existen distintos grados de tolerancia a las mutaciones en distintos genes, por ejemplo los genes de los citocromos toleran menos mutación que los genes de las proteínas de la coagulación de la sangre o los pseudogenes. Como consecuencia de esto, cuando se analiza la acumulación de mutaciones en los distintos genes parecería que algunos han acumulado muchas mutaciones mientras que otros se han mantenido casi intactos. Consecuentemente, se han propuesto distintos relojes

moleculares para muchos genes individuales, regiones genómicas, el ADN nuclear y el ADN mitocondrial (Tamarín, 1996; Hillis et al., 1996).

Una vez calculado el número de sustituciones, se puede estimar el tiempo que ha transcurrido desde que dos taxones divergieron (existencia de un ancestro común) (Tamarín, 1996). Esta información ha permitido resolver relaciones evolutivas especialmente cuando el registro fósil es ambiguo, incompleto o inexistente (Tamarín, 1996).

1.4.3. El análisis de las secuencias de los genes mitocondriales en sistemática molecular en *Lutzomyia*.

El análisis de la secuencia de genes mitocondriales, es actualmente una herramienta poderosa en la sistemática molecular y su aplicación en estudios de especiación y de poblaciones de insectos es cada vez más frecuente (Avice, 1986). La ventaja del ADN mitocondrial como un marcador molecular, es que tiene una relativamente rápida tasa de mutación, proporcionando facilidad en la detección de haplotipos (variantes en la secuencia de ADN) así como en la variación intraespecífica. La mayoría de cambios en el genoma mitocondrial de especies cercanamente relacionadas involucra sustituciones de una sola base, esto permite que el grado de divergencia de nucleótidos sea fácilmente calculado y las relaciones filogenéticas sean derivadas (Hodgkinson et al., 2002; Black & Munstermann, 1996). En un mismo organismo, se encuentran múltiples copias haploides del genoma mitocondrial, que es maternalmente heredado en animales y que no participa en eventos de recombinación meiótica. Los linajes maternos pueden ser trazados para determinar las relaciones filogenéticas de poblaciones y especies, independientemente de los efectos fundadores y de la selección o adaptación. Esta evidencia no puede ser directamente inferida de estudios de sistemas genómicos en los que se haya experimentado recombinación o herencia biparental (Black & Munstermann, 1996).

El ADN mitocondrial se ha empleado en estudios que buscan explicar las relaciones evolutivas y la genética de poblaciones de varias especies de flebótomos (Testa et al., 2002; Hodgkinson et al., 2002; Hodgkinson et al., 2003; Uribe Soto et al., 2001). El gen del citocromo b y del ARN ribosomal mitocondrial, se han empleado en estudios dentro del género *Lutzomyia* (Uribe et al., 1998). En muchos de ellos se han explicado las relaciones intraespecíficas dentro de las

series de *Lutzomyia townsendi* (Testa et al., 2002) así como en *Lutzomyia longipalpis* (Hodgkinson et al., 2002; Hodgkinson et al., 2003).

PARTE II

Caracterización de dos morfotipos encontrados en machos de *Lutzomyia (Psychodopygus) geniculata*.

La importancia médica de los miembros del subgénero (*Psychodopygus*) es considerable, ya que las hembras tienden a ser antropofílicas y se ha registrado un número cada vez mayor de ejemplares que han sido incriminados como vectores competentes de leishmaniasis. (Young & Duncan, 1994). El estatus de *Lutzomyia (Psychodopygus) geniculata* con relación a la capacidad de transmisión de *Leishmania* aún son desconocidos, sin embargo, se conoce que su distribución es amplia no solamente en Ecuador sino en otros países como Bolivia, Brazil, Belize, Colombia, Costa Rica, Guatemala, Guyana, Panamá, Perú y Venezuela (CIPA, 2001). Las colecciones entomológicas llevadas a cabo para este estudio (provincia de Orellana), permitieron la elaboración de una lista preliminar de 29 especies de flebótomos (tabla 1). Un total de 1815 especímenes fueron colectados de los cuales 1129 (62%) fueron machos y 686 (38%) hembras, siendo *Lutzomyia geniculata* (13.3%) la especie más comúnmente encontrada, seguida por *L. tortura* (11.9%), *L. hirsuta* (6.5%), *L. abunaensis* o *L. runoides* (5.8%) y *L. nocticola* (5.7%).

La investigación morfológica de los flebótomos que fueron colectados, evidenció variación morfológica en los machos de *Lutzomyia geniculata* (Barreto, 1962). Las diferencias más evidentes fueron a nivel del coxite (parte de la genitalia de los machos) y a partir de esta observación, se plantearon las siguientes hipótesis para el desarrollo de la presente investigación:

Hipótesis nula (H₀): Los machos de los dos morfotipos (coxite grueso y coxite delgado) pertenecen a la misma especie.

Hipótesis alternativa (H₁): Los machos de los dos morfotipos pertenecen a distintas especies.

Para probar estas hipótesis: (1) se realizaron las mediciones de los principales caracteres taxonómicos de especímenes que tienen coxite grueso y coxite delgado y se procedió a analizarlas estadísticamente y (2) se hizo el análisis filogenético de las secuencias del ADN de dos genes mitocondriales (citocromo b y ARNr 12S). En el caso de que la hipótesis nula sea verdadera se esperaría que otras características morfométricas sean similares o estén distribuidas uniformemente entre individuos que presentan coxite grueso y aquellos que presentan coxite delgado. Por otro lado, la comparación de las secuencias de los genes mitocondriales de individuos pertenecientes a los dos morfotipos no deberían mostrar mayores diferencias y su análisis filogenético tendría una distribución polifilética (figura 4 a). En el caso de que la hipótesis alternativa sea verdadera, esperaríamos que otras características morfométricas estén asociadas a un morfotipo pero no al otro, que la comparación de las secuencias de los genes mitocondriales de los individuos pertenecientes a los dos morfotipos presenten diferencias y que los análisis filogenéticos de estas demuestren una distribución monofilética (figura 4 b).

2. Objetivos.

2.1. Generales.

Establecer el estatus taxonómico de individuos de *Lutzomyia geniculata* que presentan diferencias a nivel del coxite.

2.2. Específicos.

2.2.1. Morfológico.

Caracterizar la genitalia de los machos de las dos morfologías, mediante un dibujo usando un microscopio con cámara lúcida.

2.2.2. Morfométrico.

Realizar las mediciones de los principales caracteres taxonómicos de especímenes que tienen coxite grueso y delgado y analizarlas estadísticamente.

2.2.3. Molecular y Filogenético.

Realizar el análisis filogenético de las secuencias del ADN de dos genes mitocondriales (citocromo b y ARNr 12S).

3. Materiales y métodos.

3.1. Estudio entomológico.

3.1.1. Área del estudio y periodo de recolección.

Las colectas entomológicas de especímenes machos y hembras se realizaron en tres lugares. (1) Estación de Biodiversidad Tiputini 76 °09 minutos W y 0° 38 minutos 20 segundos S (2) Estación de Investigación Yasuní 076° 24 minutos 01.8 segundos W y 00 °40 minutos 16.7 segundos S y (3) Mondaña 77° 13 minutos 60 segundos W y 0°51 minutos 0 segundos S (figura 5).

Los muestreos se llevaron a cabo durante los meses de Agosto del 2002, Agosto y Diciembre del 2003, completándose aproximadamente 40 noches de trampeo.

3.1.2. Colección de especímenes y biotipos.

Los flebótomos fueron colectados por medio de trampas luminosas (CDC) (figura 6). Sachets de CO₂ (Insectagator ®) fueron colocados en ciertas trampas. El trampeo se hizo durante toda la noche tanto en bosque primario, secundario, a lo largo de los senderos y en sitios adyacentes a las casas de los moradores temporales y permanentes de la zona. Las muestras entomológicas fueron recogidas temprano en la mañana y tratadas con acetato de etilo para matar los especímenes. Los flebótomos fueron separados con ayuda de un estereomicroscopio y colocados en viales que contenían alcohol etílico al 75% e inmediatamente transportados al laboratorio de Entomología Médica de la USFQ.

3.1.3. Identificación de especies.

La identificación taxonómica se realizó en base a caracteres generales como tamaño, coloración del cuerpo, venación alar y genitalia. Para la clasificación de los machos se tomaron en cuenta los siguientes parámetros taxonómicos a nivel de la genitalia: forma y tamaño del estilo, coxite, parámero y lóbulo lateral, número de espinas en el estilo, forma de la bomba genital y longitud de los filamentos genitales. Se estudió además otras estructuras de importancia taxonómica tanto en cabeza como en tórax, abdomen, alas y patas. Las hembras fueron identificadas específicamente por la forma y tamaño de las espermatecas y por la longitud de los conductos individuales y el conducto común de las mismas. Como referencia se usó la clave taxonómica publicada por Young & Duncan (1994). La identificación de las especies fue debidamente confirmada por el Dr.

François Le Pont, París, Francia. Los ejemplares que no fueron identificados como *L. geniculata* se destinaron a la colección entomológica del laboratorio de Medicina Tropical de la USFQ. Los especímenes de *L. geniculata* seleccionados para el estudio morfológico y morfométrico se dejaron durante toda la noche en una solución de NaOH al 15%. Al día siguiente se lavaron con agua destilada por tres ocasiones durante 30 minutos cada vez. Los ejemplares lavados se colocaron en la solución de Marc Andre (Anexo 1) por 3 horas. La deshidratación se hizo pasando los especímenes por una serie de concentraciones de etanol: al 70% por 3 horas, 80% por una hora y al 96% por 10 minutos. Finalmente, la cabeza, tórax, abdomen, patas y alas de cada espécimen, fueron montados con Euparal® en placas de vidrio y cubiertos con cubreobjetos.

Para el estudio molecular, se disectaron los últimos segmentos abdominales, cabeza y alas de varios ejemplares (machos de los dos morfotipos y hembras), los mismos que fueron tratados con Marc Andre y montados en placas como se describe anteriormente. El resto del cuerpo fue conservado en viales individuales en etanol al 75% hasta la extracción del ADN. Para evitar contaminación de espécimen a espécimen, tanto agujas como pinzas de disección fueron debidamente lavadas con etanol y flameadas en la llama del mechero.

3.2. Morfometría.

Para el estudio morfométrico 34 ejemplares machos de *L. geniculata*, con las dos morfologías (20 con coxite delgado y 14 con coxite grueso), fueron montados en placa de la forma antes descrita. De cada uno de los ejemplares se tomaron quince medidas de la cabeza, seis de las alas, ocho de la genitalia (el parámero no fue incluido en el análisis porque no pudo ser medido en todos los ejemplares) y nueve de las patas. En la figura 3 se indican los caracteres taxonómicos antes mencionados. Adicionalmente se midió el largo del cuerpo, mesonotum y el abdomen. La Tabla 2 muestra los valores de cada una de las mediciones. La medición de las diferentes estructuras fue posible con la ayuda de un microscopio LEICA DME equipado con cámara lúcida (calibrada acorde a una escala de 0,01mm). Los dibujos de la genitalia de los machos de los dos morfotipos: coxite delgado (placa 13050403) y coxite grueso (placa 21020303) se realizaron en un aumento de 40X, siguiendo protocolos citados en la bibliografía.

Los gráficos fueron digitalizados mediante un scanner y el programa de computación AUTOCAD 2002 (Anexo 2).

El análisis estadístico de las correspondientes mediciones se hizo mediante la prueba T para muestras independientes y por el test no paramétrico Wilcoxon. Los valores de p menores a 0.1 fueron considerados como significativamente diferentes para ambas pruebas.

3.3. Análisis molecular.

Un total de 37 ejemplares de *L. geniculata* fueron destinados para el estudio molecular: 19 hembras, 11 machos con coxite delgado, 6 con coxite grueso y un ejemplar hembra de Perú. Los grupos externos para la construcción de los árboles filogenéticos fueron las secuencias de un macho y una hembra de *L. corossoniensis*.

3.3.1. Extracción de ADN y preparación de la muestra para PCR.

El material proveniente de cada espécimen fue primeramente secado sobre papel absorbente para remover el exceso de alcohol etílico. A continuación, el ADN fue extraído usando el Dneasy Tissue Kit (Qiagen) siguiendo un protocolo modificado (Beati et al., 2004). El ADN extraído fue disuelto en 50 ul de agua destilada - ultra pura (Invitrogen).

Para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se utilizó el kit Ready-to-Go™ PCR beads (Amersham Pharmacia biotechnologies, Inc). Cada tubo de reacción fue reconstituido con 22,1 ul de agua destilada - ultra pura (Invitrogen) 1,5 ul de ADN y 0,7 ul de cada primer (10 pmoles/ul). El volumen final (25 ul) tenía: 1,5 unidades de Taq ADN polimerasa, 10 mM de Tris-HCl, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 200 mM dATP, 200 mM dCTP, 200 mM dTTP y estabilizadores.

3.3.2. Diseño de los primers.

Los primers utilizados en este estudio, fueron gentilmente donados por Lorenza Beati y Leonard E. Munstermann, Universidad de Yale. Los primers para amplificar y secuenciar el gen mitocondrial ARNr12S, fueron diseñados por Lorenza Beati en base al alineamiento de las secuencias provenientes del GenBank de un grupo ampliamente divergente de artrópodos, ie., *Drosophila*

yakuba (número de accesoión NC 001322), *Anopheles gambiae* (NC 002084), *Daphnia pulex* (Z15015) y *Apis mellifera* (L06178) (Beati & Keirans, 2001).

Estos primers amplifican parte del dominio II y del dominio III de la subunidad ribosomal pequeña 12S (Hickson et al., 1996), y han sido exitosamente utilizados en estudios que amplifican el ADN de ácaros, pulgas, garrapatas, flebótomos y en general de la mayoría de artrópodos (Beati & Keirans, 2001; Beati et al., 2004).

Los primers **T1B** (5'-AAA CTA GGA TTA GAT ACC CT-3') y **T2A** (5'-AAT GAG AGC GAC GGG CGA TGT-3'), con una longitud de 20 y 21 pares de bases (pb) cada uno, amplifican una región de aproximadamente 360 pb y corresponde al fragmento entre la posición 14,232 y 14,592 de la secuencia del genoma mitocondrial completo de *Drosophila yakuba* (número de accesoión NC 001322) (Beati & Keirans, 2001).

Los primers para la amplificación y el secuenciamiento del gen mitocondrial que corresponde a la fracción larga del gen del citocromo b, fueron diseñados por Lorenza Beati, basándose en secuencias consenso de *L. verrucarum* y *L. peruensis*. Los primers **cytbFW7** (5'-GAT AAA ATT CCA TTT CAT CCT TAT T-3') y **cytbRevo** (5'-TTT RTT TTT ATT TGA GTT CGA GG-3') con una longitud de 25 y 23 pares de bases (pb) respectivamente, amplifican una región de 700 pb.

3.3.3. Condiciones de amplificación.

Para la amplificación de los fragmentos de los genes seleccionados para el estudio (ARNr 12S) y citocromo b) se utilizó el termociclador Biometra ® *T personal* del laboratorio de Microbiología y Biología Molecular de la USFQ. Las condiciones de PCR para amplificar el gen ARNr 12S fueron: una denaturación inicial a 94°C (5 min.), seguida de 5 ciclos de denaturación a 94°C (20s), alineamiento a 52°C (30s), y elongación a 70°C (25s), seguido por 30 ciclos de denaturación a 94°C (20s), alineamiento a 54°C (30s), y elongación a 72°C (25s), y una extensión final a 72°C (5 min.) (Beati et al., 2004).

En la amplificación de la fracción larga del gen del citocromo b, el termociclador fue programado para realizar un "touchdown" y las condiciones fueron las siguientes: denaturación inicial a 95°C (5 min), seguida por 5 ciclos de denaturación a 94°C (25s), alineamiento a 54°C (25s), y elongación a 70°C (1 min). A partir del segundo ciclo se produce una disminución de 0.4°C en la temperatura de alineamiento hasta llegar a 52.4°C. Los siguientes 10 ciclos

empiezan con denaturación a 95°C (25s), alineamiento a 52°C (25s), y elongación a 68°C (1 min). A partir del segundo ciclo se disminuye la temperatura de alineamiento en 0.4°C hasta llegar a 48.4°C. Se continúa con 19 ciclos de denaturación a 95°C (25s), alineamiento a 48°C (45s), y elongación a 66°C (1 min) y una extensión final a 66°C (5 min.).

La amplificación de ADN se evidenció a través de electroforesis en geles de agarosa al 1.2%. Los productos de PCR fueron visualizados usando un transiluminador UV. Fotografías de los geles fueron tomadas por medio de un sistema de imagen digital Kodak (Anexo 3). La edición de las fotos se hizo con el programa Adobe Photoshop 6.0.

3.3.4. Purificación y secuenciamiento.

Los productos amplificados de los dos genes, fueron purificados con QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante y secuenciados en el Keck sequencing Facility (Yale University).

3.4. Análisis filogenético.

Las secuencias de ADN_r12S y citocromo b fueron alineadas individualmente por ClustalX 1.81 (Thompson et al., 1994), usando parámetros de penalidad. Los análisis filogenéticos: Neighbor joining (NJ), Maximum Parsimony (MP) y Maximum Likelihood (ML) fueron inferidos usando los métodos implementados en PAUP* 4.0b.10 (Swofford, 2002) con 10 réplicas al azar adición-taxón-adición. El modelo de evolución HKY+G fue estimado por NJ y ML usando el hLRTs de Modeltest 3.7 (Posada & Crandall, 1998). El gamma fue de 0.0051 para los datos de 12S y de 0.0418 para los datos de citocromo b. El soporte de las ramas para los árboles inferidos fue calculado por bootstrap (100 réplicas).

4. Resultados.

Las colecciones entomológicas llevadas a cabo en Tiputini, Yasuní y Mondaña (provincia de Orellana) permitieron la elaboración de una lista preliminar de 29 especies de flebótomos (tabla 1). Un total de 1815 especímenes fueron colectados de los cuales 1129 (62%) fueron machos y 686 (38%) hembras. *Lutzomyia geniculata* (13.3%) fue la especie más comúnmente encontrada, seguida por *L. tortura* (11.9%), *L. hirsuta* (6.5%), *L. abunaensis* o *L. runoides* (5.8%) y *L. nocticola* (5.7%).

4.1. Morfológicos.

Nuestro estudio taxonómico evidenció variación morfológica en los machos de *Lutzomyia geniculata* (Barreto, 1962). Las diferencias más evidentes fueron a nivel del coxite (parte de la genitalia de los machos). Los esquemas gráficos de la genitalia de cada uno de los dos morfotipos: coxite delgado (placa 13050403) y coxite grueso (placa 21020303), se pueden encontrar en el Anexo 2 y muestran una clara diferencia a nivel del coxite.

4.2. Morfométricos.

Se analizaron 34 ejemplares machos de *L. geniculata*, 20 con coxite delgado y 14 con coxite grueso. Una vez que los ejemplares fueron montados en placa, se procedió a tomar las medidas de 39 caracteres morfológicos a parte del largo y ancho del coxite (tabla 2). Las mediciones registradas fueron: en la cabeza (15), en las patas (9), en la genitalia (8) y finalmente en las alas (6). Adicionalmente se midió la longitud del cuerpo, mesonotum y abdomen.

La prueba T para muestras independientes, reveló que las diferencias eran significativas (valor de $p < 0,1$) en 20 de los 41 parámetros medidos, mientras que el test no paramétrico Wilcoxon demostró un total de 22 medidas significativamente diferentes. Topológicamente, a nivel de la cabeza 11 de las 15 mediciones fueron significativamente diferentes. De estas medidas, 8 fueron significativamente diferentes en las dos pruebas utilizadas. La medición del antenómero III tuvo diferencia estadística únicamente en la prueba T; y las mediciones del antenómero IV y el palpómero I fueron significativas en la prueba de Wilcoxon. A nivel de las alas, 5 de 6 parámetros demostraron diferencias significantes. Cuatro de ellos por medio tanto de la prueba T como de Wilcoxon. Solo las venas alares delta demostraron ser significativamente distintas por medio del análisis no paramétrico de Wilcoxon. En los restantes parámetros, 8 en total a nivel de la genitalia y 9 a nivel de las patas, hubieron diferencias significantes por medio de las dos pruebas en 6 y en uno parámetro respectivamente (Tabla 3).

4.3. Análisis molecular y filogenético.

Las relaciones filogenéticas de las secuencias de los genes mitocondriales ARNr12S y citocromo b de los 37 especímenes y que fueron inferidas por medio

de ML, no muestran asociación evidente entre las secuencias de los genes seleccionados y las características morfológicas del coxite (figuras 7 y 8).

5.- Discusión.

En el presente estudio se describen dos morfotipos asociados exclusivamente a los machos de *Lutzomyia geniculata* que fueron colectados en la provincia de Orellana-Ecuador. El ancho del coxite fue la característica morfológica más destacada y que llevó a la agrupación de los ejemplares en dos categorías (machos con coxite grueso y machos con coxite delgado). No se observaron fenotipos intermedios.

Los resultados de los análisis morfométricos evidenciaron mediante la prueba T que de las 41 estructuras anatómicas medidas, 20 resultaron ser significativamente distintas ($p < 0,1$) entre los dos morfotipos, mientras que mediante el testeo no paramétrico de Wilcoxon se registraron 22 (Tabla 3). Las estructuras con medidas estadísticamente significativas estuvieron ubicadas en la cabeza, alas, genitalia y patas. Los resultados de los análisis morfométricos apoyan la hipótesis alternativa en la que se plantea que los machos de los dos morfotipos pertenecen a especies distintas o que evidencian un proceso de especiación incipiente. Sin embargo, los resultados de la comparación de las secuencias de ADN de dos genes mitocondriales (ARNr 12s y citocromo b) mostraron que los ejemplares de los dos morfotipos analizados (coxite grueso y coxite delgado) tienen una distribución polifilética (figuras 7 y 8), lo cual sería consistente con la hipótesis de que ambos morfotipos pertenecen a la misma especie.

Tomando en conjunto estos resultados se piensa que podría tratarse de un fenómeno de polimorfismo ligado al cromosoma Y debido a que la variación morfológica se evidencia únicamente en los machos, mientras que las hembras no muestran variación morfológica aparente. Fenómenos relacionados han sido documentados en especies de peces como la *Poecilia parae*, donde los machos presentan variación en la coloración y las hembras son monomórficas. En ese estudio, Lindholm et al (2004) describen 5 colores diferentes para los machos siendo unos más abundantes que otros. Aún cuando el morfotipo más común fue el más exitoso en términos de reproducción, se determinó que las hembras prefieren dos morfotipos por sobre el más abundante. Lo que sugiere que

factores como la competencia de los machos y las estrategias en el cortejo están influenciando las preferencias de las hembras. Este estudio muestra que el sexo heterogamético, en este caso los machos, lleva en el cromosoma Y características que son beneficiosas para ese sexo. En el caso de los machos de *L. geniculata* donde más de una característica morfológica es diferente entre los dos morfotipos, se podría sugerir que el gen del cromosoma Y que está actuando es pleiotrópico o que hay más de un gen involucrado. Estudios de entrecruzamiento serán necesarios para determinar si este fenómeno es el causante de las observaciones recopiladas en este estudio, se esperaría que en los cruces de las hembras con machos con coxite delgado la descendencia tenga esa misma característica en el coxite, mientras que si la misma hembra se cruza con machos con coxite grueso la descendencia presentará ese morfotipo. Es probable que las hembras tengan preferencia por los machos con coxite delgado debido a que son más comúnmente encontrados que los machos con coxite grueso o que simplemente los machos con coxite delgado son mejores en sus tácticas de cortejo o capacidad de inseminación.

Por otro lado y debido a que los machos de los dos morfotipos han sido capturados en la misma área geográfica, un fenómeno de especiación simpátrica no puede ser descartado. Si bien este tipo de especiación no ha sido fácilmente aceptado, casos de especies en la naturaleza han sido expuestos explicando este fenómeno. Los Cichlids son peces considerados ejemplos de especiación simpátrica. Se cree que sus 500 especies han evolucionado como consecuencia de que las hembras eligen a los machos debido a su color. Las hembras prefieren un color particular y ciertos colores son más visibles dependiendo de la profundidad, de este modo las hembras encontradas a cierta profundidad se aparean con los machos visibles a esa profundidad. Esto indica que en esta población simpátrica la especiación ocurre como consecuencia de la capacidad de elección de la pareja (Galis & Metz, 1998). Este caso podría sugerir que la ocurrencia de especiación simpátrica vía selección sexual puede ser posible.

Si este fuera el caso para *L. geniculata*, se debe investigar si las hembras están presentando predilección por un morfotipo dependiendo del ancho del coxite de los machos, lo cual podría ser indicativo de un incipiente proceso de especiación simpátrica. Se sabe que los genes relacionados a la reproducción sexual suelen

presentar tasas de mutación superior a la de otros genes (Singh & Kulathinal, 2000) y esta puede ser la explicación por la que se han producido estos dos morfotipos en ausencia de diferencias detectables en los genes mitocondriales utilizados en este estudio. Por lo tanto, el siguiente paso sería secuenciar otros genes nucleares y tal vez específicamente los del cromosoma Y. Adicionalmente sería importante determinar si existen características fisiológicas que estén siendo diferentes entre los machos de los dos morfotipos. Por ejemplo analizar el comportamiento de los especímenes en cuanto a su preferencia por ciertos habitats (agujeros de los árboles, cerca de cuevas de animales, espacios abiertos, cerca de casas de pobladores, etc), investigar cuál es el volumen de su población dependiendo de la estación del año o determinar si su capacidad vectorial se ve modificada debido a su morfología. Actualmente, varios especímenes de *L. geniculata* de cada morfotipo son analizados por microscopía electrónica de barrido, esperamos que esta técnica verifique las diferencias morfológicas y morfométricas descritas en este estudio.

Nuestros resultados aparentemente contradictorios de los análisis moleculares con los morfométricos, sugiere que el uso de los parámetros morfológicos con fines taxonómicos, debería hacerse con precaución y siempre acompañado de datos moleculares.

Tabla 1. Lista preliminar de flebótomos colectados.

Especies	Machos	Hembras	Total
<i>Trichophoromyia sp</i>	452	22	474
<i>L. reburra</i>	0	1	1
<i>L. aragoi</i> or <i>L. coutinhoi</i>	3	3	6
<i>L. ubiquitousalis</i>	7	0	7
<i>L. runoides</i> or <i>L. abunaensis</i>	96	11	107
<i>L. nocticola</i>	49	55	104
<i>L. carrerai</i>	14	23	37
<i>L. hirsuta</i>	82	37	119
<i>L. amazonensis</i>	6	4	10
<i>L. geniculata</i>	14	228	242
<i>L. ayrozai</i>	2	11	13
<i>L. davisii</i>	33	52	85
<i>L. bispinosa</i>	0	1	1
<i>Pressatia sp</i>	7	0	7
<i>L. dreisbachi</i>	87	8	95
<i>L. shannoni</i>	1	0	1
<i>L. dendrophyla</i>	3	0	3
<i>L. scaffii</i>	1	0	1
<i>L. yuilli</i>	5	17	22
<i>L. flaviscutellata cf</i>	1	0	1
<i>L. richardwardi</i>	16	52	68
<i>L. pajoti</i>	1	14	15
<i>L. tortura</i>	189	28	217
<i>L. serrana</i> o <i>L. nevesi</i>	0	1	1
<i>L. infraespinosa</i>	0	1	1
<i>L. witoto</i>	17	0	17
<i>L. sordellii</i>	1	0	1
<i>L. trichopyga</i>	1	0	1
<i>L. saulensis</i>	1	0	1
<i>L. napoensis</i> or <i>L. howardi</i>	18	0	18
<i>Brumptomyia</i>	22	2	24
Unidentified	0	115	115
Subtotal	1129	686	1815
Total de especímenes colectados:			1815

Las especies en azul son nuevos registros para el Ecuador. En amarillo las especies más abundantes.

Tabla 3. Valores de p para los caracteres taxonómicos medidos.

Variable	Valor de p (Prueba T)	Valor de p (Wilcoxon)
<i>Mesonotum</i>	0.579	0.1427
Abdomen	0.1356	0.4376
Cuerpo	0.6742	0.6389

MEDIDAS DE LA CABEZA

Largo	0.4426	0.5800
Ancho	0.8468	0.1123
Distancia interocular	<0.0001*	0.00001*
Longitud del labrum a la epifaringe (E)	0.0644*	0.01569*
Largo de la faringe	0.2421	0.111
Ancho de la faringe	0.0105*	0.01587*
Antenómero AIII	0.0887*	0.1007
Antenómero AIV	0.2930	0.007827*
Antenómero AV	0.0013*	0.007827*
AIII/E	0.0013*	0.005324*
Palpómero 1	0.2341	0.05344*
Palpómero 2	0.0012*	0.0006446*
Palpómero 3	0.0002*	0.0004044*
Palpómero 4	0.8242	0.8173
Palpómero 5	0.005*	0.001035*

MEDIDAS DE LAS ALAS

Largo	0.0042*	0.01366*
Ancho	<0.0001*	0.0006214*
Venas alares Alpha	0.0006*	0.001107*
Venas alares Beta	0.2709	0.473
Venas alares Gamma	0.0682*	0.05186*
Venas alares Delta	0.1149	0.09451*

MEDIDAS DE LA GENITALIA

Largo de coxite	<0.0001*	0.00000162*
Ancho de coxite	<0.0001*	0.000001368*
Largo del estilo	<0.0001*	0.000003655*
Ancho del estilo	<0.0001*	0.000002134*
Filamentos genitales (FG)	<0.0001*	0.0000075*
Bomba genital (BG)	0.6853	0.8768
FG/BG	<0.0001*	0.03437*
Lóbulo lateral	0.3813	0.2727

MEDIDAS DE LAS PATAS

Fémur anterior	0.0372*	0.07183*
Fémur medio	0.7225	0.169
Fémur posterior	0.8903	0.2667
Tibia anterior	0.3926	0.272
Tibia media	0.1285	0.3632
Tibia posterior	0.5111	0.4775
Basitarso anterior	0.3062	0.4963
Basitarso medio	0.1429	0.7199
Basitarso posterior	0.4409	0.856

Valores con * son significativamente diferentes ($p < 0.1$)

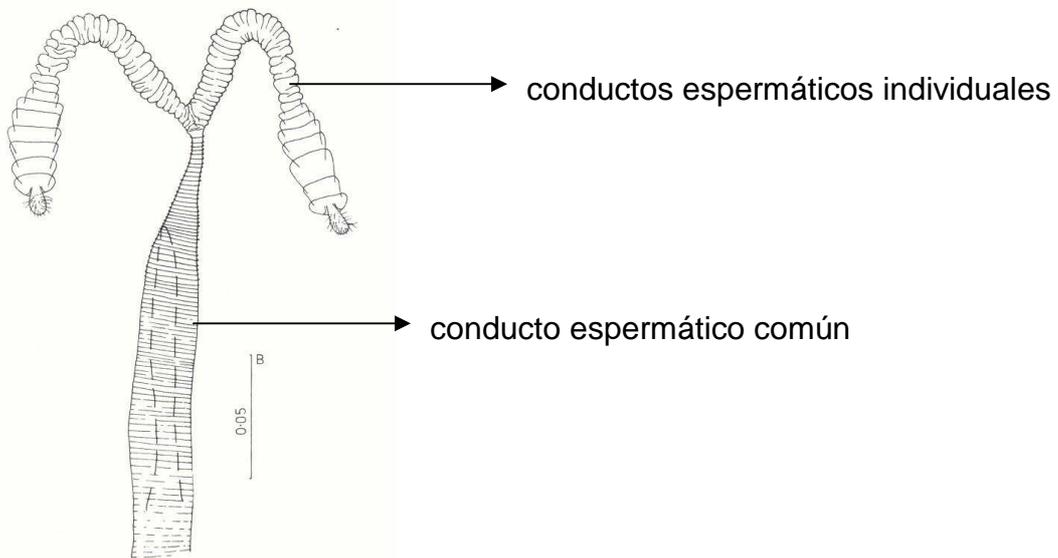
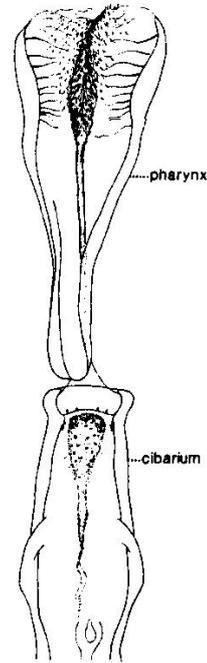
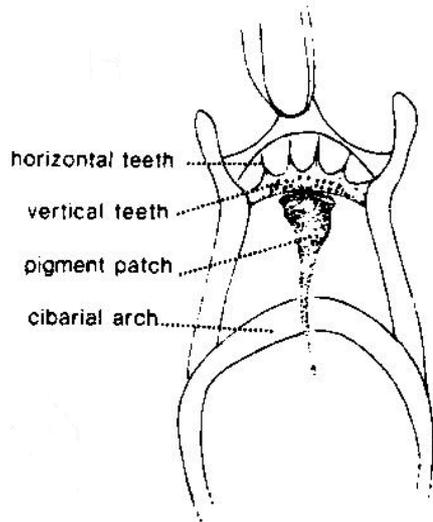
Figura 1. Flebótomo (Díptera:Psychodidae:Phlebotominae).



www.itg.be

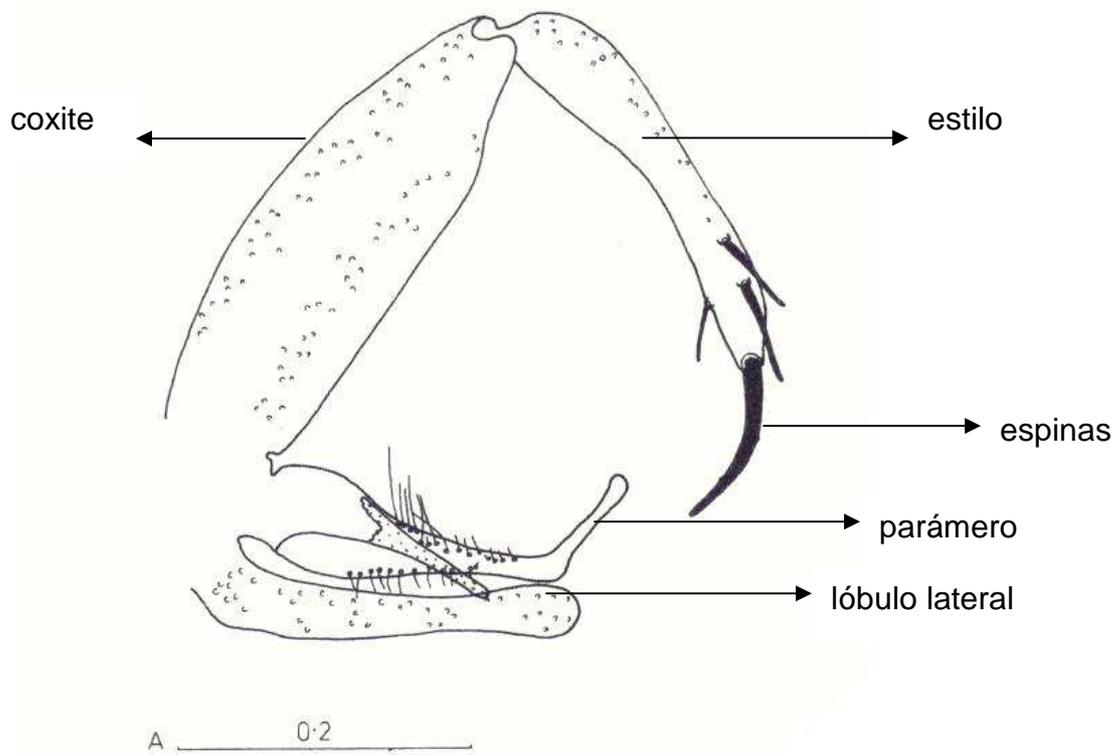
Fotografía de un flebótomo hembra. Estos pequeños Dípteros Nematóceros se caracterizan por su tamaño entre 2 a 3 mm, cuerpo cubierto de vellosidades y generalmente de apariencia blanquecina, alas erectas y patas relativamente largas

Figura 2a. Caracteres taxonómicos de las hembras del género *Psychodopygus*.



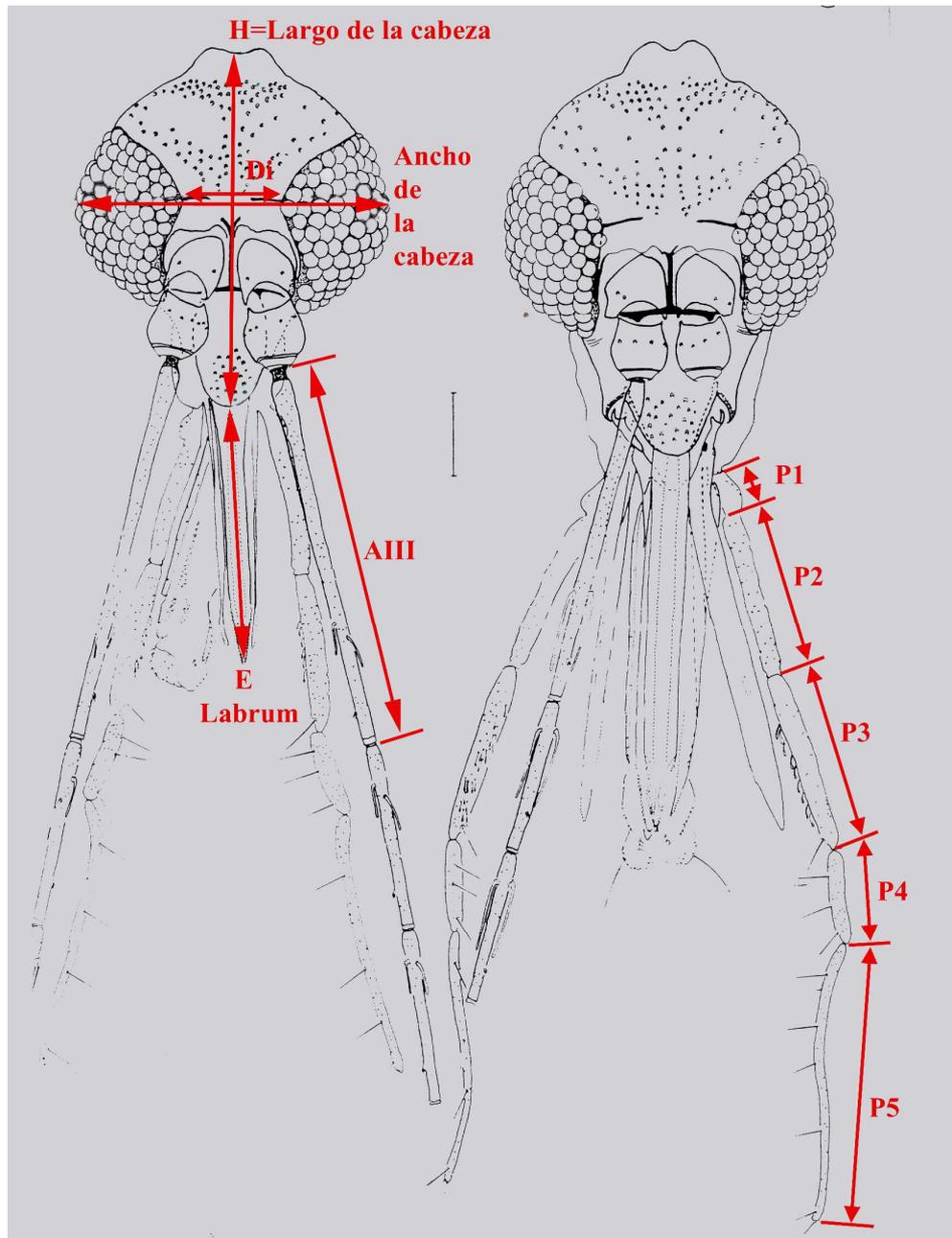
Spermateca

Figura 2b. Caracteres taxonómicos de los machos del género *Psychodopygus*.

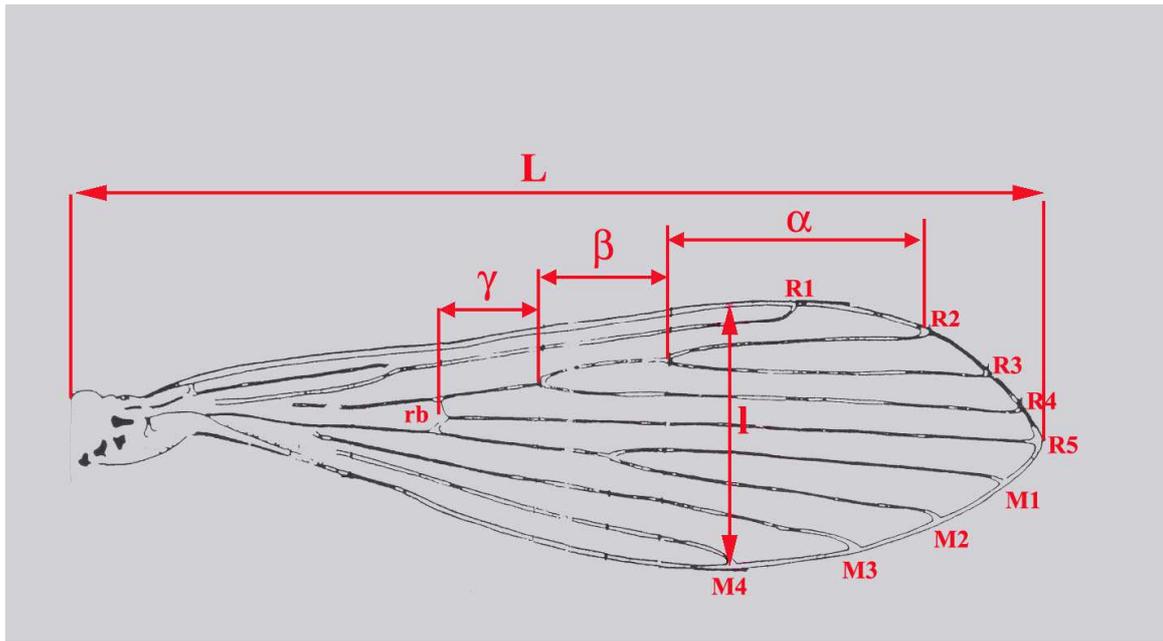


Young & Duncan, 1994.

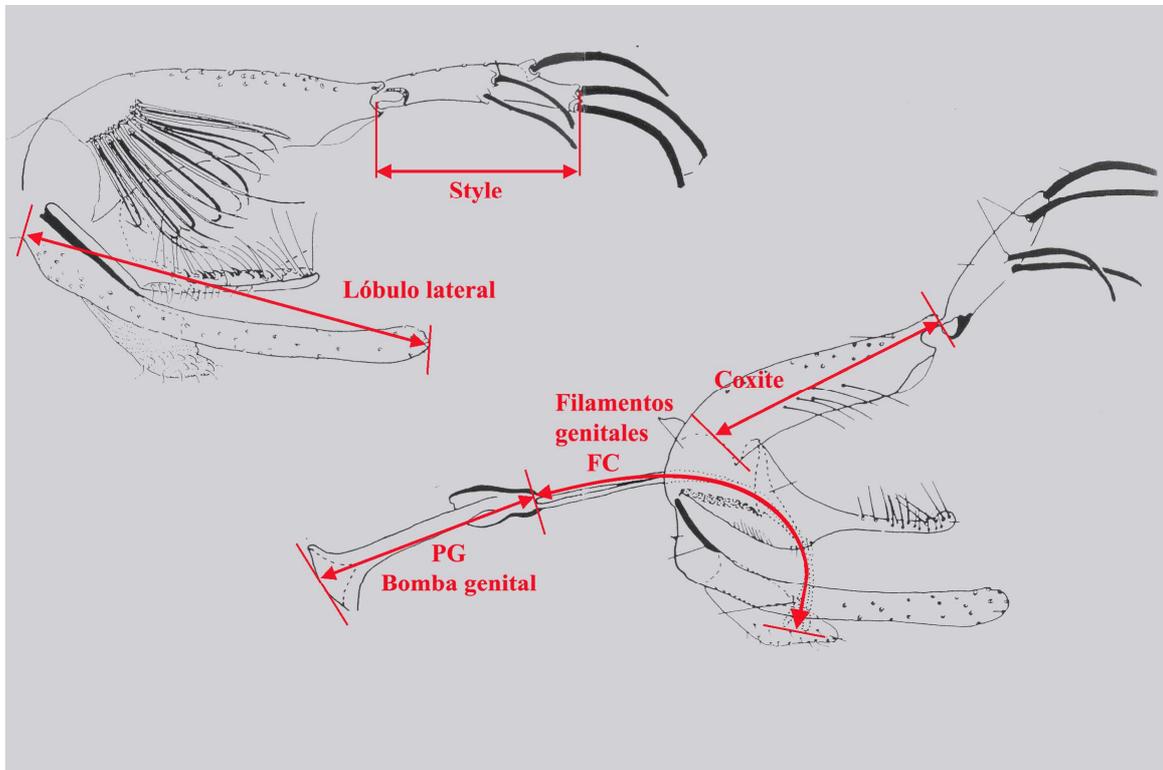
Figura 3. Caracteres taxonómicos medidos.



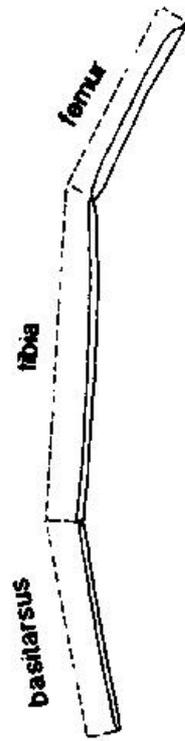
(a) Cabeza



(b) Ala



(c) Genitalia



(d) patas

Figura 4. Esquemas de agrupación de organismos.

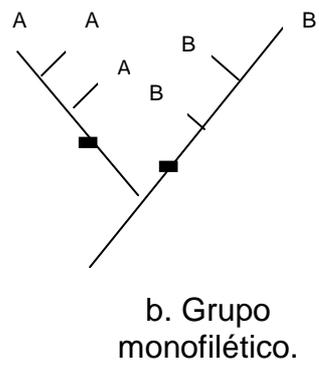
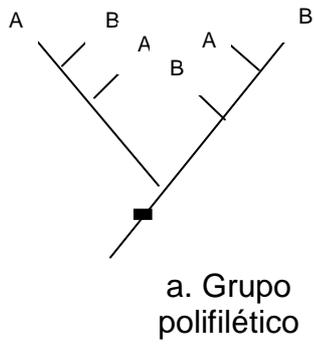


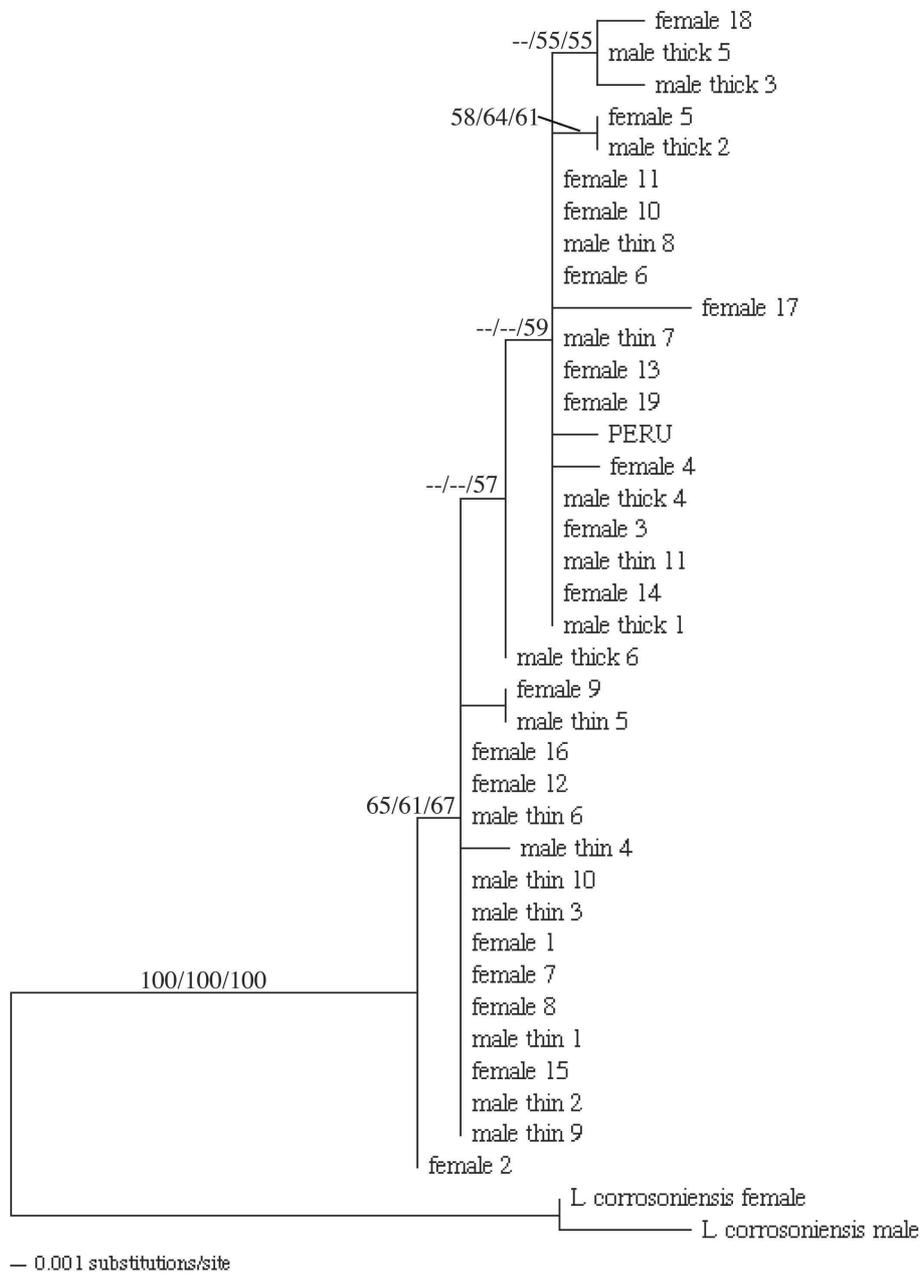
Figura 5. Área del estudio.



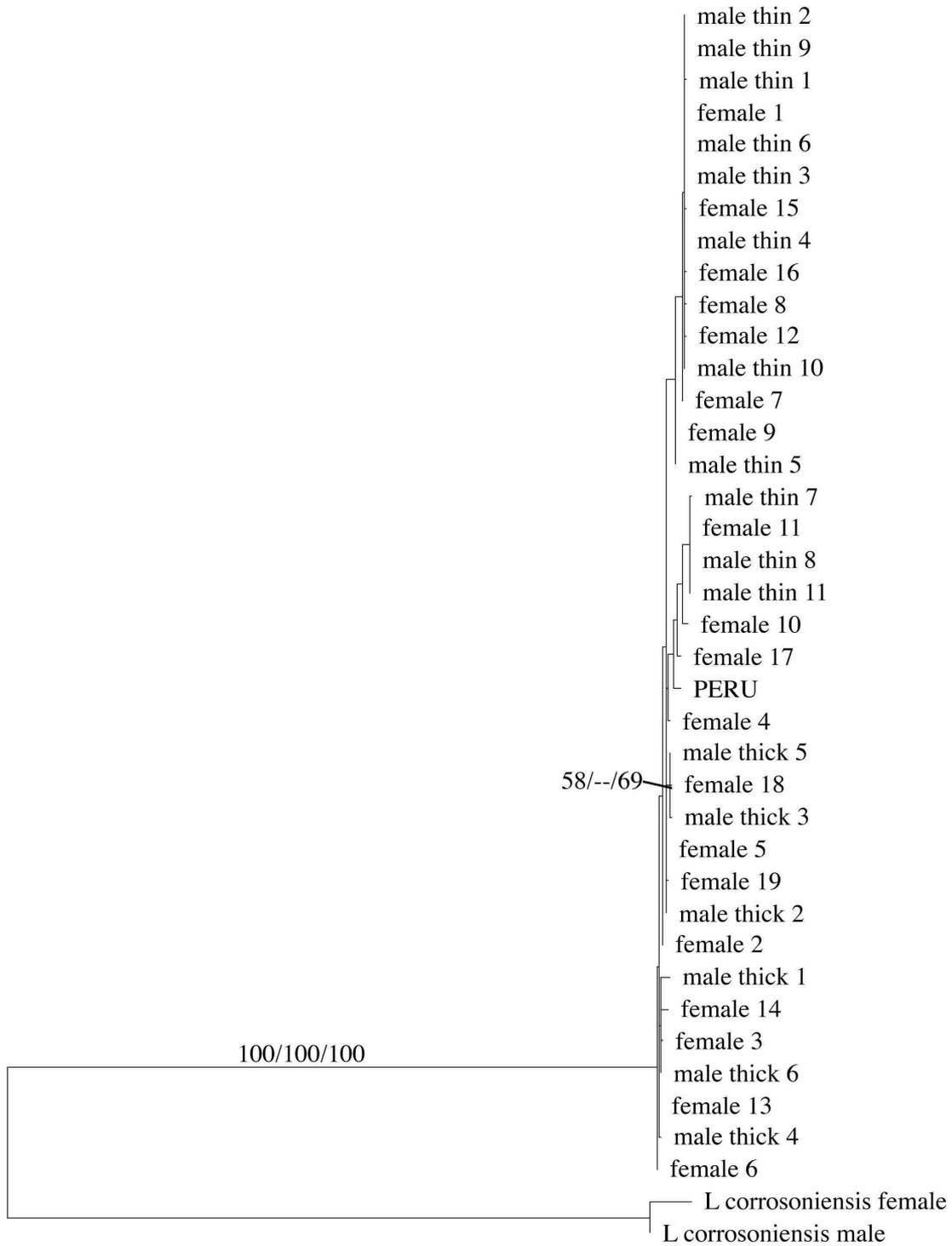
Figura 6. Trampas luminosas (CDC).



Figura 7. Árbol por Maximum Likelihood (secuencias de ADNr 12S).



**Figura 8. Árbol por Maximum Likelihood
(secuencias de citocromo b).**



6. Referencias.

Abzhanov, A., Protas, M., Grant, R., Grant, P., Tabin, C., 2004. *Bmp4* and morphological variation of beaks in Darwin's finches. *Science*. **305** (5689), 1462-1465.

Adamson, R.E., Ward, R.D., Feliciangeli, M.D., Maingon, R., 1993. The application of random amplified polymorphic DNA for sand fly species identification. *Med. Vet. Entomol.* **7**, 203-207.

Amunarriz, M., 1982. Salud y Enfermedad. Patología Tropical en la Región Amazónica. Ed. CICAME, Prefectura Apostólica del Aguarico, Pompeya, Napo, Región Amazónica Ecuatoriana.

Amunarriz, M., 1984. Salud y Enfermedad. Patología Tropical en la Región Amazónica. Ed. CICAME, Prefectura Apostólica del Aguarico, Pompeya, Napo, Región Amazónica Ecuatoriana.

Awise, J.C., 1986. Mitochondrial DNA and the evolutionary genetics of higher animals. *Phil. Trans. Roy. Soc. (B)* **312**, 325-342.

Beati, L., Keirans, J.E., 2001. Analysis of the systematic relationships among ticks of the genera *Rhipicephalus* and *Boophilus* (Acari: Ixodidae) based on mitochondrial 12S ribosomal DNA gene sequences and morphological characters. *J. Parasitol.* **87** (1), 32-48.

Beati, L., Cáceres, A.G., Lee, J.A., Munstermann, L.E., 2004. Systematic relationships among *Lutzomyia* sand flies (Diptera: Psychodidae) of Peru and Colombia based on the analysis of 12S and 28S ribosomal DNA sequences. *Internat. J. Parasitol.* **34**, 225-234.

Black IV, W.C., Munstermann, L.E., 1996. Molecular taxonomy and systematics of arthropod vectors. En: Beaty, B.J., Masquardt, W.C. (eds). *The biology of disease vectors*. University of Colorado Press: Niwot, Colorado.

CIPA (Computer-aided Identification of Phlebotomine sandflies of America), 2001. Internet site: <http://cipa.snv.jussieu.fr/>

Davies, C.R., Reithinger, R., Campbell-Lendrum, D., Feliciangeli, D., Borges, R., Rodriguez, N., 2000. The epidemiology and control of leishmaniasis in Andean countries. *Cad. Saúde Pública.* **16** (4), 925-950.

De la Riva, J., Le Pont, F., Ali, V., Matias, A., Mollinedo, S., Dujardin, J.P., 2001. Wing Geometry as a tool for studying the *Lutzomyia longipalpis* (Diptera:Psychodidae) complex. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* **96** (8), 1089-1094.

Desjeux, P., 1996. Leishmaniasis : public health aspects and control. *Clinics in Dermatol.* **14**, 417-423.

Dias, E.S., Fortes-Dias, C.L., Stiteler, J.M., Perkins, P.V., Lawyer, P.G., 1998. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis of *Lutzomyia longipalpis* laboratory populations. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo.* **40** (1), 49-53.

Dujardin, J.P., Le Pont, F., Cruz, M., León, R., Tarrieu, F., Guderian R., Tibayrenc, M., 1996. Cryptic speciation in *Lutzomyia* (*Nyssomyia*) *trapidoi* (Fairchild & Hertig) (Diptera:Psychodidae) detected by multilocus enzyme electrophoresis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **54** (1), 42-45.

Dujardin, J.P., Le Pont, F., Galati., E.A.B., 1999. Cryptic speciation suspected by morphometry within *Lutzomyia runoides*. *C.R. Acad. Sci. Paris, Sciences de la vie.* **322**, 375-382.

Dujardin, J.P., Le Pont, F., 2000. Morphometrics of a neotropical sandfly subspecies, *Lutzomyia carrerai thula*. *C.R. Acad. Sci. Paris. Sciences de la vie.* **323**, 273-279.

Dujardin, JP., Le Pont. F., Martínez, E., 2004. Is *Lutzomyia serrana* (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) present in Ecuador? *Parasite.* **11**, 211-217.

Galati, E.A.B., 1995. Phylogenetic systematics of Phlebotominae (Diptera:Psychodidae) with emphasis on American groups. *Bol. Dir. Malariol. Saneamient. Ambient.* **35**, 133-142.

Galis, F., Metz, J., 1998. Why are there so many cichlid species? *Tree.* **13** (1): 1-2.

Gállego, J., 1998. *Manual de Parasitología: Morfología y biología de los parásitos de interés sanitario.* Universitat de Barcelona. 155.

Grattapaglia. 1996. Introducción al uso de marcadores moleculares en el análisis genético. Brasilia, Embrapa, Cenargen. 221.

Ghosh, K.N., Mukhopadhyay, J.M., Guzman, h., Tesh, R.B., Munstermann, L.E., 1999. Interspecific hybridization and genetic variability of *Phlebotomus* sandflies. *Medical and Veterinary Entomology*. **13**, 78-88.

Hall, B.H., 2001. *Phylogenetic Trees Made Easy. A how to manual for molecular biologists*. Sinauer Associates, Inc. Sunderland, Massachusetts. USA.

Hashiguchi, Y., 2001. *Studies of New World Leishmaniasis and its transmission, with particular reference to Ecuador. Chapter 2: A global situation of leishmaniasis*. Kiowa Printing & Co. Ltd, Kochi city, Kochi, Japan. Research report series No **6**, 8-11.

Hickson, R.E., Simon, C., Cooper, A., Spicer, G.S., Sullivan, J., Penny, D., 1996. Conserved sequence motifs, alignment, and secondary structure for the third domain of the animal 12S rRNA. *Mol. Biol. Evol.* **13**, 150-169.

Hodgkinson, V.H., Birungi, J., Haghpanah, M., Joshi, S., Munstermann, L.E., 2002. Rapid identification of mitochondrial cytochrome b haplotypes by SSCP in *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) populations. *J. Med. Entomol.* **39** (4): 689-694.

Hodgkinson, V.H., Birungi, J., Quintana, M., Deitze, R., Munstermann, L.E., 2003. Mitochondrial cytochrome b variation in the visceral leishmaniasis vector *Lutzomyia longipalpis* in a transect through eastern Brazil. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **69** (4): 386-392.

Kumar, S., Tamura, K., Nei M., 2004. Mega 3: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. www.megasoftware.net/mega3

Lainson R, Shaw JJ., 1987. Evolution, classification and geographical distribution. En: Peters, W., Killick-Kendrick, R. (eds). *The leishmaniasis in Biology and Medicine*. Academic Press: London. **1**:1-120.

Lampo, M., Torgerson, D., Márquez, L.M., Rinaldi, M., García, C.Z., Arab, A., 1999. Occurrence of sibling species of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera:

Psychodidae) in Venezuela: first evidence from reproductively isolated sympatric populations. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **61**, 1004-1009.

Lewis, D.J., Young, D.G., Fairchild, G.B., Minter, D.M., 1977. Proposal for a stable classification of the phlebotominae sand flies (Diptera: Psychodidae). *Syst. Ent.* **2**, 319-332.

Lindholm, A.K., Brooks, R., Breden, F., 2004. Extreme polymorphism in a Y-linked sexually selected trait. *Heredity.* **92**, 156-162.

MSP (Ministerio de Salud Pública del Ecuador), 2004. Dirección Nacional de Epidemiología. Estadísticas de las enfermedades de la piel. Leishmaniasis. Fuente Epi 2. Elaboración: Eduardo Aguilar.

Mukhopadhyay, J., Ghosh, K., Ferro, C., Munstermann, L.E., 2001. Distribution of phlebotomine sand fly genotypes (*Lutzomyia shannoni*, Diptera: Psychodidae) across a highly heterogeneous landscape. *J. Med Entomol.* **38** (2): 260-267.

Odum, E.P., 1986. Fundamentos de ecología. Interamericana. 343-345.

Posada, D., Crandall, K. A., 1998. ModelTest: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics.* **14**, 817-818.

Rodríguez, J.D., 1974. Lecciones de Parasitología Humana: Género *Leishmania*. (5th edit). Departamento de Publicaciones de la Universidad de Guayaquil, Guayaquil, Ecuador. Pp170-185.

Sacks, D., Kamhawi, S., 2001. Molecular aspects of parasite – vector and vector – host interactions in Leishmaniasis. *Annu. Rev. Microbiol.* **55**, 453-483.

Santamaría, E., Munstermann, L.E., Ferro, C., 2002. Estimating carrying in a newly colonized sand fly *Lutzomyia serrana* (Diptera: Psychodidae). *J. Econ. Entomol.* **95** (1), 149-154.

Singh, R. S., Kulathinal R.J., 2000. Sex gene pool evolution and speciation: a new paradigm. *Genes Genet Syst.* **75**(3), 119-130.

Smith, R.L., Smith, T.M., 2001. Genética de poblaciones y especiación. En: Ecología 4ta edición. Editorial Addison Wesley.

Swofford, D.L., Olsen, G. J., Waddell, P.J., Hills, D.M., 1996. Phylogenetic Inference. En: Hills, D.M., Moritz, C., Mable, B.K. (eds). Molecular Systematics. Sinauer Associates, Inc. Massachusetts. USA.

Swofford, D.L., 2002. PAUP*: Phylogenetic analysis using parsimony. Version 4.0b.10. Sinauer Associates: Sunderland, MA.

Tamarín, R.H., 1996. Genética de poblaciones: el equilibrio Hardy – Weinberg y los sistemas de apareamiento. En: Principios de Genética. Editorial Reverté, S.A. Barcelona.

Tesh, R., Guzman, H., 1996. Sand flies and the agents they transmit. En: Beaty, B.J., Masquardt, W.C. (eds)., 1996. The biology of disease vectors. University of Colorado Press: Niwot, Colorado.

Testa, J.M., Montoya-Lerma, J., Cadena, H., Oviedo, M., Ready, P.D., 2002. Molecular identification of vectors of *Leishmania* in Colombia: Mitochondrial introgression in the *Lutzomyia townsendi* series. *Acta Tropica*. **84**, 205-218.

Thompson, J. D., Higgins, D. G., Gibson, T. J., 1994. Clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucl. Acids Res.* **22**, 4673-4680.

Uribe Soto, S.I., Porter, C., Vélez, D., 1998. Amplificación y obtención de secuencias de Rna mitocondrial en *Lutzomyia* spp. (Diptera: Psychodidae) vectores de leishmaniasis. *Rev. Colomb. Entomol.* **24**, 109-115.

Uribe Soto, S.I., Lehmann, T., Rowton, E.D., Vélez, I.D., Porter, C.H., 2001. Speciation and population structure in the morphospecies *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva) as derived from the mitochondrial ND4 gene. *Mol. Phylogenet. Evol.* **18**, 84-93.

Vandamme, A., 2003. Basic concepts of molecular evolution. En: Salemi, M., Vandamme, A. (eds). The phylogenetic handbook: A practical approach to DNA and protein phylogeny. Cambridge University Press.

WHO, 1996. The leishmaniases and *Leishmania* HIV co-infections. 1-4, Fact sheet No. 116, WHO, Geneva.

Young, D.G., Duncan, M.A., 1994. Guide to the identification and geographic distribution of *Lutzomyia* sand flies in Mexico, the West Indies, Central and South America (Diptera: Psychodidae). Memoirs of the American Entomological Institute, 54, Associated Publishers-American Entomological Institute, Gainesville, FL.

Anexo 1. Fórmula de Marc André.

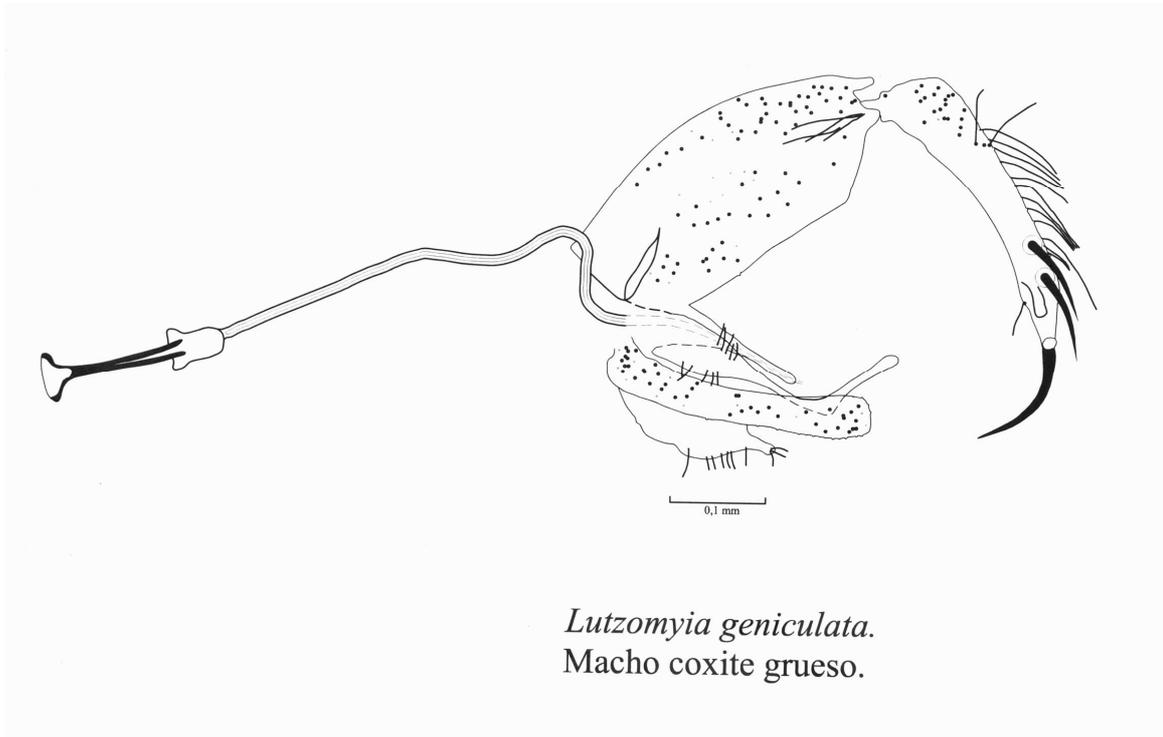
Agua destilada.....30ml.

Hidrato de cloral (cristales).....40 g.

Acido acético glacial.....30 ml.

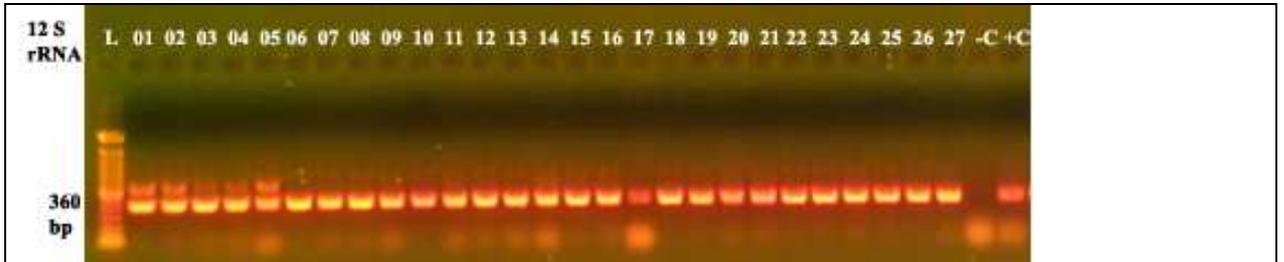
**Anexo 2. Gráficos en AUTOCAD 2002:
coxite delgado (placa 13050403) y coxite grueso (placa 21020303).**





Lutzomyia geniculata.
Macho coxite grueso.

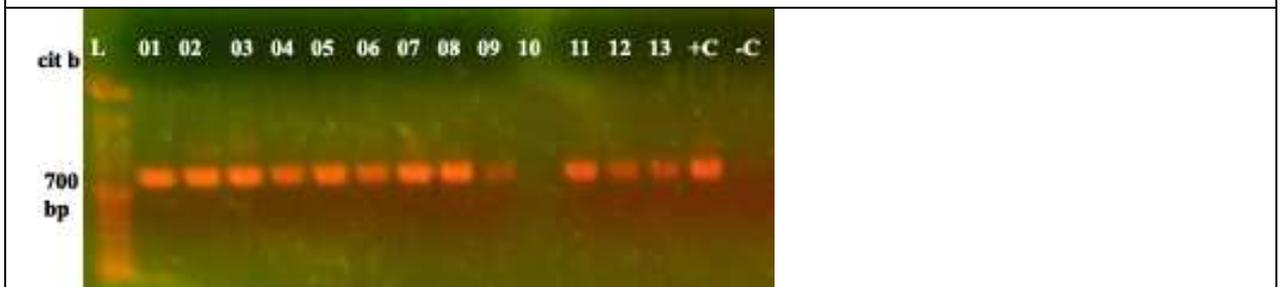
Anexo 3. Fotografías de los geles de agarosa al 1.2%.



Electroforesis en gel de agarosa mostrando los fragmentos amplificados por PCR del gen **ARNr12S**.

L= Ladder (100 pb), números = número de muestra, -C= control positivo, +C= control negativo.

Tamaño de banda esperada: 360 pb.



Electroforesis en gel de agarosa mostrando los fragmentos amplificados por PCR del gen del **citocromo b**.

L= Ladder (100 pb), números = número de muestra, -C= control positivo, +C= control negativo.

Tamaño de banda esperada: 700 pb.